

540, 215

Rec'd USPTO 20 JUN 2005

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
15. Juli 2004 (15.07.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/058999 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12Q 1/68**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/004293

(22) Internationales Anmeldedatum:  
19. Dezember 2003 (19.12.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 60 556.4 21. Dezember 2002 (21.12.2002) DE  
103 25 637.7 6. Juni 2003 (06.06.2003) DE  
103 25 636.9 6. Juni 2003 (06.06.2003) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): UNIVERSITÄT LEIPZIG [DE/DE]; Ritterstrasse 26, 04009 Leipzig (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): ZIMMERMANN, Gerolf [DE/DE]; Dölitzweg 20, 04207 Leipzig (DE). ALEXANDER, Henry [DE/DE]; Kurt-Huber-Weg 4, 04299 Leipzig (DE).

(74) Anwalt: KAILUWEIT & UHLEMANN; Bamberger Strasse 49, 01187 Dresden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:  
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD AND MEANS FOR DETERMINING SPECIFIC CONDITIONS OR CHANGES IN THE UTERINE EPITHELIUM AND IN THE EPITHELIUM OF OTHER ORGANS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND MITTEL ZUR BESTIMMUNG VON BESTIMMTEN ZUSTÄNDEN BZW. VERÄNDERUNGEN IM UTERUSEPITHELIUM UND IM EPITHELIUM ANDERER ORGANE

**WO 2004/058999 A2**

(57) Abstract: The invention relates to a method and means for determining specific conditions or changes in the uterine mucosa or in the epithelium of other organs. The method permits the overexpression of mRNA of type I- $\beta$  sub-units ( $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e) of human chorionic gonadotropin to be determined.  $\beta$ 6e is a recently determined type I- $\beta$  sub-unit. The determined  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 and  $\beta$ 6e expression is used to indicate the receptivity of the uterine mucosa to implantation of an embryo or to indicate neoblastic or tumorous changes in epithelia.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung gibt ein Verfahren und Mittel zur Bestimmung von definierten Zuständen oder Veränderungen in der Uterusschleimhaut oder im Epithel anderer Organe an. Mit dem Verfahren wird die Überexpression der mRNA von Typ-I- $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e) von humanen Choriongonadotropin bestimmt.  $\beta$ 6e ist eine neu ermittelte Typ-I- $\beta$ -Untereinheit. Anhand der ermittelten  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e-Expression können Aussagen über die Rezeptivität der Uterusschleimhaut für die Implantation eines Embryos oder neoblastische und tumoröse Veränderungen in Epithelien getroffen werden.

## Verfahren und Mittel zur Bestimmung von bestimmten Zuständen bzw. Veränderungen im Uterusepithel und im Epithel anderer Organe

Die Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zur Bestimmung von definierten Zuständen  
5 bzw. Veränderungen im Uterus. Zustände des Uterusepithel oder Epithelien anderer Organe, die mit der Erfindung insbesondere bestimmt werden sollen, sind die Rezeptivität der Uterusschleimhaut für die Implantation eines Embryos oder neoblastische und tumoröse Veränderungen. Anwendungsgebiet ist die Medizin, insbesondere die Gynäkologie und die Onkologie.

10

Humanes Choriongonadotropin (hCG) ist ein Hormon, dessen Konzentration während der Schwangerschaften erhöht ist, und bei Schwangerschaftstests nachgewiesen wird. hCG besteht aus zwei Untereinheiten  $\alpha$ -hCG und  $\beta$ -hCG in nicht-konvalenter Bindung. Für die Untereinheit  $\alpha$ -hCG ist ein Gen bekannt (Chromosom 6q21.1-q 23). Für die  
15 Untereinheit  $\beta$ -hCG sind 7 Gene  $\beta$ 8,  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 5,  $\beta$ 3,  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 bekannt (Chromosom 19q13.3).

Während der Schwangerschaft werden durch Trophoblasten der Gebärmutter größere Mengen hCG-Dimer und freie  $\alpha$ -hCG- und  $\beta$ -hCG-Moleküle gebildet und in das Blut sezerniert. Aber auch in einigen nicht-trophoblastären Geweben wird hCG bzw. seine  
20 Untereinheiten in geringen Mengen exprimiert (2-6). Auch im Blut nichtschwangerer gesunder Menschen werden daher hCG-Konzentrationen von hCG bis 1000 pg/ml und von  $\beta$ -hCG bis 100 pg/ml beobachtet (7, 8). Höhere  $\beta$ -hCG-Serumwerte deuten auf einen gonadalen oder nicht-gonadalen Tumor hin und kennzeichnen eine ungünstige Prognose, wie bei Lungen-, Blasen-, Prostata-, Colon-, Nierenzell- und  
25 Mammakarzinom beschrieben (5, 9-13).

Embryonales trophoblastäres Gewebe exprimiert fast ausschließlich hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8 und  $\beta$ 3. Diese  $\beta$ -hCG Untereinheiten werden daher auch trophoblastäres  $\beta$ -hCG (t $\beta$ -hCG) oder Typ I- $\beta$ -hCG genannt.  
30 hCG  $\beta$ 7 und  $\beta$ 6 werden nur in geringem Umfang in einigen nicht-trophoblastären Geweben, wie z. B. Mamma, Lunge, Prostata, Skelettmuskulatur, Blase, Colon, Uterus, exprimiert (17). Diese  $\beta$ -hCG Untereinheiten werden daher auch als nicht-trophoblastäres  $\beta$ -hCG oder Typ II- $\beta$ -hCG bezeichnet.

Während die Untereinheiten des Typ II- $\beta$ -hCG ( $\beta$ 5,  $\beta$ 8 und  $\beta$ 3) an Position 117 (Exon 3) der Aminosäuresequenz ein Aspartat (Asp, D) enthalten, enthält Typ I- $\beta$ -hCG ( $\beta$ 7 und  $\beta$ 6) an Position 117 ein Alanin (Ala, A).

5 In der Vergangenheit sind verschiedene Studien mit dem Ziel durchgeführt worden, die  $\beta$ -hCG-Transkripte in verschiedenen normalen und neoplastischen Geweben nicht-trophoblastärer Herkunft mit semiquantitativer Methode nachzuweisen (5, 11, 12, 18). Diese Methoden zeigen, dass  $\beta$ -hCG in normaler Plazenta (19), gesunden Testes (6), aber auch neoplastischen Testes (20) und neoplastischem Blasengewebe (21) 10 transkribiert wird. In diesen Studien wird jedoch nicht zwischen Typ I- $\beta$ -hCG und Typ II- $\beta$ -hCG unterschieden.

In einer Arbeit (9) wird die Anwesenheit von hCG  $\beta$ 7 in gesundem und von hCG  $\beta$ 8,  $\beta$ 5,  $\beta$ 3 in malignem Blasengewebe durch spezifische Restriktionsenzyme für die Erkennung 15 einzelner Transkripte nachgewiesen.

Eine weitere Arbeit bestimmt die Überexpression von Typ II- $\beta$ -hCG ( $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3) in malignem transformiertem nicht-trophoblastärem Gewebe durch den ermittelten Transformationsindex, bestehend im Verhältnis zwischen der Genexpression von 20 hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 zur Gesamtexpression aller  $\beta$ -hCG-Gene im selben Gewebe. Er wird mit Primern zwischen Exon 2 und Exon 3 erfasst, die die Punktmutation C117 in der C-terminalen Region des  $\beta$ hCG im Exon 3 erkennen (17). Bisher wird diese Punktmutation Asp - Ala in Position 117 der  $\beta$ -hCG-Aminosäureketten im genannten Quotient als diagnostischer Parameter der neoplastischen Transformationen genutzt.

25

Eine Tumорidentifizierung durch Analyse der Sekretionsprodukte, insbesondere der Nutzung des Typ II- $\beta$ -hCG als Indikator für eine Krebserkrankung, zeigte eine französische Arbeitsgruppe bereits 1996. Beschrieben wird von Bellet et al. (17), dass die  $\beta$ -Untereinheit von hCG durch vier nicht-allele  $\beta$ -hCG-Gene codiert wird. Zu den 30 wesentlichen Erkenntnissen gehört, dass die maligne Transformation nicht-trophoblastären Gewebes stets mit der Expression von  $\beta$ -hCG-Genen verbunden ist, die normalerweise im Trophoblast transkribiert werden. Die Erforschung der  $\beta$ -hCG-Gene, die durch nicht-trophoblastäres Gewebe exprimiert werden, führt zu dem

Ergebnis: normales nicht-trophoblastäres Gewebe exprimiert hauptsächlich  $\beta$ -hCG-Gene vom Typ I (hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6), während nach maligner Transformation auch  $\beta$ -hCG-Gene vom Typ II (hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3) exprimiert werden.

- 5 In US-PS 6,194,154 wird ein Verfahren zur Bestimmung der malignen Transformation humaner Zellen beschrieben, das die Überexpression von hCG  $\beta$ 3,  $\beta$ 5,  $\beta$ 8 und  $\beta$ 9-mRNA in malignen Zellen mit der Expression von hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 in nicht-malignen Zellen vergleicht. Bestimmt wird auch die Steigerung der mRNA-Expression von hCG  $\beta$ 3,  $\beta$ 5,  $\beta$ 8 und  $\beta$ 9 im Verhältnis zur Gesamt- $\beta$ -Genexpression in den malignen Zellen.
- 10 Weiterhin wird ausgeführt, dass die Punktmutation in der mRNA-Nukleotidsequenz von Position 775 für  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 ein A und für  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 ein C anzeigt und in der Aminosäure-position 117 somit Aspartat (Asp, D) oder Alanin (Ala, A) codiert. Auf dieser Basis baut sich ein Testkit auf, der Verbreitung gefunden hat.
- 15 WO 0190344 nimmt Bezug auf den Promotor, Enhancer und andere Regulatoren, die die Expression des Proteins  $\beta$ -hCG im testikulären Karzinom kontrollieren. Weiterhin erfolgen Ausführungen zur Gentherapie unter Einschleusung von Promotorgen- $\beta$ -hCG-DNA in verschiedene Zellen, z.B. in Liposomen. Das  $\beta$ -hCG-Protein wird in verschiedenen Tumorgeweben als diagnostischer Parameter verwendet.

20

- Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren und Mittel zur Bestimmung von definierten Zuständen bzw. Veränderungen im Uterus und in anderen Organen, insbesondere der Uterusschleimhaut aber auch in den Epithelien anderer Organe, anzugeben. Zustände des Uterus die mit der Erfindung insbesondere bestimmt werden sollen, sind die
- 25 Aufnahmefähigkeit der Uterusschleimhaut für die Implantation eines Embryos oder neoplastische und tumoröse Veränderungen.

- Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur Bestimmung von definierten Zuständen bzw. Veränderungen im Uterus, bei dem mRNA aus einer Blut- und/oder Gewebeprobe isoliert wird und in dieser Probe eine quantitative Messung der mRNA-Genexpression von  $\beta$ 7-hCG und/oder  $\beta$ 6-hCG und/oder  $\beta$ 6e-hCG.
- 30

β6-hCG hat die Gensequenz (cDNA) gemäß SEQ ID No 5 und β7-hCG gemäß SEQ ID No 6.

β6e-hCG ist eine überraschenderweise neu ermittelte Variante des Typ-I-β-hCG (β6 oder β7), mit einer Gensequenz (cDNA) gemäß SEQ ID NO 7. Das β6e-hCG-Gen wird 5 im Endometrium exprimiert und codiert für ein Protein gemäß SEQ ID No 17 oder SEQ ID No 18.

In einer bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als interner Standard die Gesamt-βhCG-mRNA-Genexpression oder die mRNA-Genexpression 10 einzelner oder aller Typ-II-β-hCG-Untereinheiten (β5-hCG, β8-hCG, β3-hCG) gemessen. Die mRNA-Genexpression von β7-hCG- und/oder β6-hCG und/oder β6e-hCG wird zur Auswertung dann zu dem Referenzstandard in Relation gesetzt.

Bevorzugt erfolgt die quantitative Messung der mRNA-Genexpression mittels 15 quantitativer RT-PCR. In dem bekannten Prozess der RT-PCR wird zunächst mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) basierend auf der isolierten RNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Als Primer für die RT wird ein Oligonucleotid mit einer poly-dT-Sequenz gewählt (oligo-dT). Das oligo-dT ist bevorzugt aus 10 bis 20 Deoxythymidin (dT)-Monomeren aufgebaut. Einzelne cDNAs werden in der 20 anschließenden PCR mit einem sequenzspezifischen Primerpaar amplifiziert.

Die Sequenz mindestens eines Primers wird dabei vorzugsweise so gewählt, dass der Primer mit einer β-hCG-cDNA-Sequenz hybridisiert, die durch die Verbindung von 2 Exons gebildet wird. Durch diese Auswahl wird erreicht, dass durch den Primer nur 25 cDNA, jedoch nicht mögliche in der Probe enthaltene Verunreinigungen an genomischer β-hCG-DNA amplifiziert werden.

Als externer Standard wird bevorzugt eine definierte Menge an mRNA oder auch cDNA von β7-hCG bzw. β5-hCG in einer parallel unter identischen Bedingungen 30 durchgeführten Messung verwendet.

Besonders bevorzugt wird die PCR als Real-time-PCR durchgeführt. Bekannte Real-time PCR Verfahren sind z. B. die TaqMan, FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) und Beacon-Verfahren. Durch die Verwendung von Fluoreszenz-markierten

Pimern kann bei diesem Verfahren vorteilhaft das PCR-Produkt während der PCR quantifiziert werden.

Die Erfindung beansprucht auch die Real time-Messung als one tube-RT-PCR oder die

5 Verwendung anderer Methoden zur quantitativen Erfassung der Expression spezifischer Genkopien neben SYBR Green I, wie zum Beispiel der Einsatz von genspezifischen Oligonukleotiden als Hybridisierungsproben mit unterschiedlichen Farbstoff- oder Fluoreszenzmarker-Anbindung (TaqMan, FRET, Beacon).

10 In einer besonders bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens wird basierend auf der durch die Reverse Transkriptase (RT) erhaltene cDNA in einem ersten PCR-Schritt mit mindestens einem ersten Primerpaar Gesamt- $\beta$ hCG-cDNA amplifiziert.

15 Die Amplifikation von Gesamt- $\beta$ hCG wird dadurch erreicht, dass dieses erste Primerpaar sowohl mit cDNA von Typ-II- $\beta$ -hCG-Untereinheiten ( $\beta$ 5-hCG,  $\beta$ 8-hCG,  $\beta$ 3-hCG), als auch Typ-I- $\beta$ -hCG-Untereinheiten ( $\beta$ 7 und  $\beta$ 6 und  $\beta$ 6e) hybridisiert.

In einem anschließenden zweiten PCR-Schritt wird mit mindestens einem dritten Primer

20 die cDNA einzelner oder aller Typ-I- $\beta$ -hCG-Untereinheiten ( $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e) spezifisch amplifiziert.

Damit im zweiten Schritt nur Typ-I- $\beta$ -hCG und nicht Typ-II- $\beta$ -hCG amplifiziert wird, wird der dritte Primer so gewählt, dass er nur mit cDNA von  $\beta$ 7-hCG und  $\beta$ 6-hCG und  $\beta$ 6e-hCG spezifisch hybridisiert, jedoch nicht mit cDNA von  $\beta$ 5-hCG,  $\beta$ 8-hCG und  $\beta$ 3-hCG.

25

Bevorzugt wird in dem zweiten PCR-Schritt, d. h. einer sogenannten „nested PCR“, zusätzlich mit mindestens einem vierten Primer die cDNA von mindestens einer oder mehreren Typ-II- $\beta$ -hCG-Untereinheiten ( $\beta$ 5-hCG und/oder  $\beta$ 8-hCG und/oder  $\beta$ 3-hCG) spezifisch amplifiziert. Dazu wird der vierte Primer so gewählt, dass er mit cDNA von

30  $\beta$ 5-hCG,  $\beta$ 8-hCG und  $\beta$ 3-hCG spezifisch hybridisiert, jedoch nicht mit cDNA von  $\beta$ 7-hCG und  $\beta$ 6-hCG und  $\beta$ 6e-hCG.

Die Primer für den zweiten Schritt der PCR können vor oder nach Durchführung des ersten Schritts der PCR zugegeben werden.

Die dritten und vierten Primer sind vorzugsweise mit unterschiedlichen Markermolekülen versehen, die eine Unterscheidung zwischen den PCR-Produkten, die durch die Amplifikation mit dem dritten und vierten Primer gebildet werden, ermöglichen.

5

Bevorzugt wird als erster Primer des ersten Primerpaars zur Amplifikation von Gesamt- $\beta$ hCG ein 10 bis 30 Basenpaar-langes DNA-Oligonukleotid aus Exon 1 des  $\beta$ hCG gewählt. Ein derart bevorzugter Primer hat die Sequenz gemäß SEQ ID NO 1.

10 Bevorzugt wird als zweiter Primer des ersten Primerpaars zur Amplifikation von Gesamt- $\beta$ hCG ein 10 bis 30 Basenpaar-langes DNA-Oligonukleotid der komplementären Sequenz von Exon 3 des  $\beta$ hCG gewählt. Ein derart bevorzugter Primer hat die Sequenz gemäß SEQ ID NO 2.

15 Weitere bevorzugte Primer für das Primerpaar zur Amplifikation von Gesamt- $\beta$ hCG sind Primer mit Sequenzen gemäß SEQ ID NO 11 und SEQ ID NO 14.

Als dritter Primer zur spezifischen Amplifikation von Typ-I- $\beta$ hCG wird bevorzugt ein 10 bis 30 Basenpaar-langes DNA-Oligonukleotid aus dem Bereich des  $\beta$ 7-hCG gewählt.

20 Ein derart bevorzugter Primer hat die DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO 3. Weitere bevorzugte Primer zur spezifischen Amplifikation von Typ-I- $\beta$ hCG sind Primer mit Sequenzen gemäß SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 13 und SEQ ID NO 16.

25 Als vierter Primer zur spezifischen Amplifikation von Typ-II- $\beta$ hCG wird bevorzugt ein 10 bis 30 Basenpaar-langes DNA-Oligonukleotid aus dem Bereich des  $\beta$ 5-hCG gewählt. Ein derart bevorzugter Primer hat die DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO 4. Weitere bevorzugte Primer zur spezifischen Amplifikation von Typ-II- $\beta$ hCG sind Primer mit Sequenzen gemäß SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 12 und SEQ ID NO 15.

30 Für die bevorzugte Realtime-PCR ist mindestens einer der Primer fluoreszenzmarkiert. Besonders bevorzugt ist der dritte Primer mit einem solchen Fluoreszenzmarker versehen um eine Quantifizierung der amplifizierten Typ-I- $\beta$ hCG cDNA während der PCR zu ermöglichen.

Bevorzugt ist auch einer der beiden Primer des ersten Primerpaars und gegebenenfalls der vierte Primer mit Fluoreszenzmarkern versehen, wobei sich jedoch die Marker dieser Primer untereinander und zu Primer 1 in ihren Adsorptions- und/oder Emmissionspektren unterscheiden.

5 Durch diese unterschiedlichen Fluoreszenzmarker wird eine parallele Quantifizierung der amplifizierten Typ-I- $\beta$ hCG cDNA und gegebenenfalls Typ-II- $\beta$ hCG cDNA während der PCR und ein Vergleich mit der Gesamt- $\beta$ hCG cDNA möglich.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird anhand des Flussschemas aus **Fig. 1** erläutert.

10 Der in Fig.1 verwendete Primer 1 (Amplifikation von Gesamt- $\beta$ hCG) ist nicht markiert, Primer 2 (Amplifikation von Gesamt- $\beta$ hCG) enthält den Fluoreszenzmarker NED.

15 Der in Fig.1 zur Amplifikation von Typ-I- $\beta$ -hCG ( $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e) verwendete Primer 3 ist mit 6-FAM markiert. Primer 4 zur Amplifikation von Typ-II- $\beta$ -hCG ( $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3) enthält den Fluoreszenzmarker HEX.

Die Auswahl der Primer ist in **Fig. 2** dargestellt.

20 Fig. 2 zeigt ein Sequenzalignment der Sequenzen  $\beta$ 5-hCG („CG5“),  $\beta$ 7-hCG („CG 6“),  $\beta$ 7-hCG ("CG7") und  $\beta$ 7-hCG („Endo“). \* bezeichnet den Transkriptionsstart, \*\* bezeichnet den Translationsstart.

25 Die Ziffern über den Nukleinsäuresequenzen bezeichnen die Aminosäurepositionen des codierten Proteins. Durch Unterstreichung sind die Sequenzbereiche markiert, die mit den Primern hybridisieren.

30 Die Oligonukleotid-Primerpaare 1 und 2, gemäß SEQ ID No 1 und No 2, 1 und 11, gemäß SEQ ID No1 und No11, sowie 14 und 2, gemäß SEQ ID No 14 und No2 des Sequenzprotokolls wurden derart ausgewählt, dass sie unter Verwendung der Gesamt-RNA und der RT-PCR-Methode in einem ersten Amplifikationsschritt die Summe aller  $\beta$ hCG-Transkripte  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 und auch  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 in gleicher Effizienz darstellen. Diese genannten Primerpaare schließen die  $\beta$ LH-Amplifikation wegen differenter Nukleotidsequenzfolgen aus.

Im folgenden nested PCR-Schritt oder unter Verwendung der Real time RT-PCR-Quantifizierungsmethode wird unter Verwendung der Primer 3 und 2, Primer 9 bzw. 10 und 2, Primer 13 und 11 sowie Primer 16 und 12 das Transkript  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e und mit Primer 4 und 2, Primer 8 und 2, Primer 12 und 11 sowie Primer 15 und 2 das Transkript  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 amplifiziert.

5 Durch den Primer 9 mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO 9 wird nur  $\beta$ 6-hCG und nicht  $\beta$ 7-hCG und  $\beta$ 6e-hCG amplifiziert.

10 Durch den Primer 10 mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO 10 wird nur  $\beta$ 7-hCG und  $\beta$ 6e-hCG amplifiziert und nicht  $\beta$ 6-hCG amplifiziert.

Durch den Primer 13 mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO 13 wird nur  $\beta$ 7-hCG und  $\beta$ 6-hCG und nicht  $\beta$ 6e-hCG amplifiziert.

15

Durch eine parallele Vervielfältigung von cDNA mit den Primern 9, 10 und 13 (mit den Sequenzen SEQ ID NO 9 und/oder SEQ ID NO 10 und/oder SEQ ID NO 13) kann überraschend zwischen der mRNA-Expression von  $\beta$ 7-hCG und  $\beta$ 6-hCG und  $\beta$ 6e unterschieden werden.

20

Dazu wird bevorzugt eine RT-PCR durchgeführt, die der oben beschriebenen Methode zur Unterscheidung der Expression von Typ I und Typ II  $\beta$ -hCG entspricht, mit dem Unterschied, dass im zweiten Schritt zwei unterschiedlich markierte Primer aus der Gruppe der Sequenzen SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 13 verwendet werden.

25

Die Erfindung liefert ein Modell für tumorspezifische Gentranskription speziell eines neuen Promotors  $\beta$ hCG, der nur in verschiedenen Tumorgeweben aktiviert wird, einschließlich, aber nicht begrenzt auf das testikuläre Karzinom. Die Erfindung gibt auch 30 Methoden zur Analyse der Promotorexpression Typ-I- $\beta$ -hCG-Untereinheiten und Typ-II- $\beta$ -hCG-Untereinheiten an. Dazu wird eine PCR Primer 15 und 16 (SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 16) die mit dem Promoterbereich hybridisieren durchgeführt.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens mittels RT-PCR wird bevorzugt ein Diagnostischer Kit verwendet, jeweils eine Menge der folgenden Bestandteile enthält:

5 1. für die cDNA-Synthese:

- a.) Oligo-dT;
- b.) Reverse Transkriptase;

2. für die PCR:

10 c.) mindestens zwei Primer, die mit cDNA einer oder mehrerer Typ-II-  
β-hCG-Untereinheiten Typ-I-β-hCG ( $\beta 7$ ,  $\beta 6$ ,  $\epsilon\beta 6$ ) hybridisieren, wobei  
mindestens einer der beiden Primer sequenzspezifisch für Typ-I-  
β-hCG ist, d. h. nicht mit Typ-II-β-hCG ( $\beta 5$ ,  $\beta 8$ ,  $\beta 3$ ) hybridisiert;  
d.) eine über 80°C beständige DNA-Polymerase, wie z. B. taq-Polymerase;

15

sowie entsprechende Reaktionspuffer.

20 Zusammensetzungen derartiger Reaktionspuffer sind dem Fachmann bekannt und  
enthalten üblicherweise RNase-Inhibitor und für als Bausteine für die Polymerase  
dNTPs, sowie eine Menge zweiwertiger Kationen, wie Mg<sup>2+</sup>.

25 Vorzugsweise enthält der diagnostische Kit eine Menge eines ersten Primerpaars, das  
sowohl mit cDNA von Typ-II-β-hCG ( $\beta 5$ ,  $\beta 8$ ,  $\beta 3$ ) als auch Typ-I-β-hCG ( $\beta 7$ ,  $\beta 6$  und  $\beta 6\epsilon$ )  
hybridisiert und einen dritten Primer, der sequenzspezifisch für Typ-I-β-hCG ist, also  
nicht mit Typ-II-β-hCG ( $\beta 5$ ,  $\beta 8$ ,  $\beta 3$ ) hybridisiert.

30

Bevorzugt wird als erster Primer des ersten Primerpaars zur Amplifikation von Gesamt-  
βhCG ein 10 bis 30 Basenpaar-langes DNA-Oligonukleotid aus Exon 1 des βhCG  
gewählt. Ein derart bevorzugter Primer hat die DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO 1.

Bevorzugt wird als zweiter Primer des ersten Primerpaars zur Amplifikation von  
Gesamt-βhCG ein 10 bis 30 Basenpaar-langes DNA-Oligonukleotid der komplementären  
Sequenz von Exon 3 des βhCG gewählt. Ein derart bevorzugter Primer hat die DNA-  
Sequenz gemäß SEQ ID NO 2.

Weitere bevorzugte Primer für das Primerpaar zur Amplifikation von Gesamt- $\beta$ hCG sind Primer mit Sequenzen gemäß SEQ ID NO 11 und SEQ ID NO 14.

Als dritter Primer zur spezifischen Amplifikation von Typ-I- $\beta$ hCG wird bevorzugt ein 10 5 bis 30 Basenpaar-langes DNA-Oligonukleotid aus dem (bitte ergänzen) Bereich des  $\beta$ 7- hCG gewählt. Ein derart bevorzugter Primer hat die DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO 3.

In einer Bevorzugten Ausführungsform enthält der diagnostische Kit eine Menge eines 10 vierten Primers, der mit cDNA von Typ-I- $\beta$ -hCG spezifisch hybridisiert, jedoch nicht mit cDNA von Typ-II- $\beta$ -hCG. Weitere bevorzugte Primer zur spezifischen Amplifikation von Typ-I- $\beta$ hCG sind Primer mit Sequenzen gemäß SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 13 und SEQ ID NO 16.

15 Als vierter Primer zur spezifischen Amplifikation von Typ-II- $\beta$ hCG wird bevorzugt ein 10 bis 30 Basenpaar-langes DNA-Oligonukleotid aus dem (bitte ergänzen) Bereich des  $\beta$ 5- hCG gewählt. Ein derart bevorzugter Primer hat die DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO 4. Weitere bevorzugte Primer zur spezifischen Amplifikation von Typ-II- $\beta$ hCG sind Primer mit Sequenzen gemäß SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 12 und SEQ ID NO 15.

20

Bevorzugt ist mindestens einer der Primer fluoreszenzmarkiert. Dies ermöglicht die Durchführung einer Real-time-PCR.

25 Besonders bevorzugt sind ein Primer des ersten Primerpaars, der dritte Primer und gegebenenfalls der vierte Primer mit Fluoreszenzmarkern, die sich in ihren Adsorptions- und/oder Emmissionspektren zueinander unterscheiden, zu versehen.

Bestandteil der Erfindung sind auch die Primersequenzen mit den Sequenzen gemäß SEQ ID NO 3 und SEQ ID NO 4 sowie SEQ ID NO 8 bis SEQ ID NO 16.

30

Das Verfahren wird erfindungsgemäß zur Bestimmung von definierten Zuständen oder Veränderungen im Uterus verwendet.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können die Aufnahmefähigkeit der Uterusschleimhaut für die Implantation eines Embryos oder auch neoplastische und tumoröse Veränderungen festgestellt werden.

5 Eine bevorzugte Verwendung des Verfahrens ist die Verwendung zur Diagnostik der Rezeptivität der Uterusschleimhaut (Implantationsdiagnostik).

Unter der Diagnostik der Rezeptivität der Uterusschleimhaut wird im Sinne der vorliegenden Erfindung das Feststellen von optimalen Implantationsbedingungen, d. h.

10 das Erkennen der Möglichkeit verstanden, dass für eine befruchtete Eizelle in der Uterusschleimhaut optimale Bedingungen bestehen, sich einzubetten und dort nachfolgend zu wachsen.

Der Erfindung liegt die wissenschaftliche Erkenntnis zugrunde, dass die Höhe der

15 Expression der Gene von Typ-I- $\beta$ -hCG ( $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\epsilon\beta$ 6) im normalen sekretorischen Epithelium der Uterusschleimhaut (Endometrium) oder in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes ein zuverlässiger Indikator für eine mögliche erfolgreiche Implantation darstellen. Umso höher die Expression umso besser sind die Chancen für eine erfolgreiche Implantation einer befruchteten Eizelle oder eines Embryos.

20

Der erfindungsgemäßen Verwendung liegt die wissenschaftliche Erkenntnis zugrunde, dass ein zuverlässiger Indikator für eine mögliche erfolgreiche Implantation die Bewertung des Anteils der exprimierten 5'-nichttranslatierenden Promotorsequenzen des  $\beta$ hCG (Exon 1) von  $\beta$ hCG-Gen  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 absolut oder relativ zu  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 darstellt.

25

Die Gene hCG  $\beta$ 7 und  $\beta$ 6 des Genclusters werden hauptsächlich im normalen sekretorischen Epithelium der Uterusschleimhaut exprimiert. Die Gene hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 des Genclusters werden im normalen Trophoblast und im karzinom-transformierten Epithel exprimiert. Lymphozyten (CD3), Natural Killer Zellen und Monozyten (CD14) exprimieren bei Normalpersonen hCG  $\beta$ 5.

Zur erfindungsgemäßen Diagnostik der Rezeptivität der Uterusschleimhaut ist die Bestimmung der Expression von hCG und des allelen Gens  $\beta$ 7 erforderlich. Es wurde erkannt, dass der Gehalt an  $\beta$ 6- und  $\beta$ 7-hCG von im körpereigenen epithelialen

Gewebe oder Blutzellen den Erfolg einer Implantation wesentlich bestimmt, und dass deshalb die Kenntnis der Menge an hCG  $\beta$ 7 und  $\beta$ 6 absolut oder relativ betrachtet in Kenntnis des Quotienten aus hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 als Zähler und hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 als Nenner Aufschluß über den erfolgversprechenden Implantationsmoment gibt.

5

Zur Bestimmung des hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e und des hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3-Anteils ist die quantitative RT-PCR geeignet.

10 Zur Diagnostik der Rezeptivität der Uterusschleimhaut wird einer Patientin vorzugsweise Gewebe vom Endometrium oder von der Zervixschleimhaut oder Peripherblut entnommen wird und die Analyse der mRNA-Expression in dieser Blut- oder Gewebeprobe mit dem erfindungsgemäßen verfahren bestimmt. Aus der Höhe der ermittelten mRNA-Expression von  $\beta$ 7-hCG und/oder  $\beta$ 6-hCG und/oder  $\beta$ 6e-hCG können dann Rückschlüsse auf die Aufnahmefähigkeit der Gebärmutter für einen 15 Embryo im aktuellen oder Folgezyklus getroffen werden.

20 Dazu werden bevorzugt 4 bis 6 Tage nach der Ovulation Zellen mit einem Minikatheter aus der Gebärmutterhöhle, mit einem Wattebausch aus dem Zervikalkanal oder mit einem Holzspatel von der Mundschleimhaut Zellen gewonnen bzw. peripheres EDTA- bzw. Heparinblut entnommen. Aus den aufgenommenen Zellen wird die mRNA  $\beta$ hCG isoliert, durch RT-PCR cDNA hergestellt, die cDNA amplifiziert und quantitativ bestimmt.

25 Die Herstellung und Amplifikation der cDNA aus der mRNA erfolgt vorzugsweise durch Real time-Messung in einer one tube-RT-PCR. Alternativ werden anderer Methoden zur erfindungsgemäßen quantitativen Erfassung der Expression von spezifischer Genkopien verwendet, vorzugsweise unter Einsatz von genspezifischen Oligonukleotiden als Hybridisierungsproben mit unterschiedlichen Farbstoff- oder 30 Fluoreszenzmarker-Anbindung (TaqMan, FRET, Beacon).

Ein positiver Nachweis der mRNA von  $\beta$ 6-hCG,  $\beta$ 7-hCG oder  $\beta$ 6e-hCG zeigt an, dass sich das Endometrium in Richtung einer Implantationsreife differenziert.

Eine weitere bevorzugte Verwendung des Verfahrens ist die Verwendung zur retrospektiven Diagnostik der Rezeptivität der Uterusschleimhaut. Unter retrospektiven Implantationsdiagnostik wird im Sinne der vorliegenden Erfindung verstanden, das im vergangen Zyklus optimale Implantationsbedingungen bestanden haben. Über die 5 Aussage der Implantationsbedingungen im vergangenen Zyklus lassen sich Prognosen über die Implantationsbedingungen, d. h. die Aufnahmebereitschaft der Gebärmutter für eine befruchtete Eizelle oder einen Embryo, im Folgezyklus machen.

Zur retrospektiven Diagnostik der Rezeptivität der Uterusschleimhaut wird prinzipiell, 10 wie zur vorbereitenden Implantationsdiagnostik verfahren, mit dem Unterschied, dass die Analyse der  $\beta$ 6- und  $\beta$ 7-hCG-Expression in einer Probe von Menstrualblut erfolgt. Im Menstrualblut sind ausreichend Zellen des Endometrium vorhanden, die eine Analyse ermöglichen.

15 Der Vorteil der Analyse im Menstrualblut gegenüber der zuvor beschriebenen Methode, liegt darin, dass sie nicht invasiv ist. Es muss weder Peripherblut noch eine Gewebeprobe aus der Gebärmutter entnommen werden.

Eine weitere bevorzugte Verwendung des Verfahrens ist die Anwendung zur 20 Tumordiagnostik.

Der erfindungsgemäßen Verwendung liegt die wissenschaftliche Erkenntnis zugrunde, dass ein zuverlässiger Indikator für das Vorhandensein und das Wachstum von Tumorzellen die Bewertung des Anteils exprimierter 5'-nichttranslatierenden Promotorsequenzen des  $\beta$ hCG (Exon 1) von  $\beta$ hCG-Gen  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 zu  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 darstellt, die sich in diesem Genausschnitt in einer Vielzahl von Nukleotiddifferenzen unterscheiden.

Im Unterschied zur Mutation eines einzigen Nukleotides im Codons 117 des vorbeschriebenen C117-Assays (Exon 3) differieren die  $\beta$ hCG-Gene  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 zu denen von  $\beta$ 5, 30  $\beta$ 8,- $\beta$ 3 in diesem Genabschnitt des  $\beta$ hCG-Promotorgens. (Exon 1) in einer hohen Anzahl von Nukleotiden, zwischen Gen 5 und Gen 7 mit n=20 und mit den gewählten Primern n=12. Außerdem wird mit dem einbezogenen Exon 1 der möglicherweise verfälschende Anteil der Genexpression hCG  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 für die Gesamtexpression aller  $\beta$ hCG-Gene verhindert.

Bevorzugt werden zum Nachweis von Uteruskarzinomen einer Patientin Gewebe von Endometrium oder Zervix entnommen und die mRNA-Expression in dieser Gewebeprobe mit dem erfindungsgemäßen Verfahren analysiert.

5

Vorzugsweise werden die Werte der mRNA-Expression in Tumorgewebe mit den Werten der mRNA-Expression in gesundem Gewebe verglichen.

In einer besonders bevorzugten Variante der Verwendung wird dazu der Wert der 10 mRNA-Expression von  $\beta$ 7-hCG und/oder  $\beta$ 6-hCG und/oder  $\beta$ 6e hCG durch die Summe der Expression mRNA-Expression von Gesamt- $\beta$ hCG geteilt und aus der Höhe des so erhaltenen Quotienten Rückschlüsse auf den Grad der Bösartigkeit des Tumors getroffen.

15 Es wurde gefunden, dass in einigen neoplastischen und tumorösen nicht-trophoblastären Geweben verstärkt hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 und im neoplastischen Trophoblast zusätzlich hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 exprimiert werden.

20 Die Erfindung wird nachstehend in Ausführungsbeispielen näher erläutert, ohne auf diese beschränkt zu sein. Dabei zeigen:

Ausführungsbeispiel 1: RT-PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern zur Diagnostik der Rezeptivität der Uterusschleimhaut für eine Embryoimplantation

25 Ausführungsbeispiel 2: RT-PCR mit nicht-markierten Primern zur Diagnostik der Rezeptivität der Uterusschleimhaut für eine Embryoimplantation

Ausführungsbeispiel 3: RT-PCR mit nicht-markierten Primern zur retrospektiven Diagnostik der Rezeptivität der Uterusschleimhaut für eine Embryoimplantation

30 Ausführungsbeispiel 4: RT-PCR mit nicht-markierten Primern zur Tumordiagnostik

Ausführungsbeispiel 5: RT-PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern zur Tumordiagnostik

35 Ausführungsbeispiel 6: RT-PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern zur Tumordiagnostik

**Ausführungsbeispiel 1:**

Zur Diagnostik der Rezeptivität der Uterusschleimhaut werden der Patientin Zellen mit einem Minikatheter aus der Gebärmutterhöhle oder mit einem Wattebausch aus der Zervix oder mit einem Holzspatel von der Mundschleimhaut entnommen. Die Zellen

5 werden bis zur Weiterverarbeitung sofort bei minus 80° C eingefroren und gelagert. Zur Analyse wird aus den aufgenommenen Zellen eine Trizol-RNA-Extraktion durchgeführt, die cDNA des endometrialen hCG im nachfolgenden RT-PCR-Prozeß spezifisch amplifiziert und quantitativ erfaßt.

10 Es kann davon ausgegangen werden, dass die Anwesenheit von hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 und  $\beta$ 6e ein Indikator für eine optimale Implantation darstellt. Das Fehlen von hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 und  $\beta$ 6e zeigt das Gegenteil an: eine mögliche Implantation ist in diesem Zyklus nicht zu erwarten. Von besonderer Bedeutung ist der Fakt, dass mit der  $\beta$ hCG-Diagnostik fehlendes oder hochaufgebautes sekretorisches Endometrium erkannt werden kann, so

15 dass die Diagnose auch einen Therapiehinweis gibt. Zu beachten ist, dass hCG  $\beta$ 6 und  $\beta$ 6e im wesentlichen durch hCG  $\beta$ 7 repräsentiert werden kann (sechs Nukleotiddifferenzen im Exon 1 zu 24 Nukleotiddifferenzen zwischen  $\beta$ 7 und  $\beta$ 5). Mit der im Sequenzprotokoll angegebenen Auswahl verschiedener Primer können die hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e-Anteile summarisch, aber auch für hCG  $\beta$ 7 und hCG  $\beta$ 6 direkt bestimmt

20 werden. Andererseits kann der Nachweis von geringem bis erhöhtem hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8, und  $\beta$ 3 im endometrialen Gewebe oder deren Zellen einen Hinweis auf eine Tumorerkrankung darstellen. Die Gewebeproben können auch analog nach der Methode der fraktionierten Abrasio gewonnen werden.

25 Endometriales Gewebe (10 - 30 mg) oder Zellen dieser Herkunft werden sofort nach Entnahme in Flüssigstickstoff oder bei -80° C eingefroren. Für die Untersuchung der drei exprimierten Anteile hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 und  $\beta$ 6e sowie hCG  $\beta$ 8,  $\beta$ 5,  $\beta$ 3 und Gesamt- $\beta$ hCG wird die Total-RNA mit Trizol extrahiert und etwa 1  $\mu$ g der RNA für 60 min bei 42° C unter Standardbedingungen und Einsatz von Oligo-dT(15)-Primer reverse-30 transkribiert.

In diesem Ausführungsbeispiel wird zur Diagnostik der Rezeptivität der Uterusschleimhaut der Anteil der genspezifisch exprimierten  $\beta$ hCG-Amplifikate  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e im Endometrium zum Gesamt-hCG-Anteil von hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 plus hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3

bewertet. Dazu wird die nested RT-PCR-Methode benutzt, die im ersten RT-PCR-Schritt den Gesamtanteil von  $\beta$ hCG mit spezifischen Primern und dem Fluoreszenzmarker 1 und im folgenden nested PCR-Schritt mit diesem Produkt einmal hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e mit Fluoreszenzmarker 2 und hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 mit Fluoreszenzmarker 3 vermisst. Ein Software-Programm berechnet als Quotient den Anteil von hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e zum Gesamtanteil des  $\beta$ hCG.

*Nutzung von Methoden:* Gewebeentnahme zur Diagnostik, Lagerung in Flüssigstickstoff, RNA-Extraktion (23), RT-PCR mit fluoreszenzmarkiertem Primerpaar, Erfassung der Gesamt- $\beta$ hCG-Expression  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 und  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 und  $\beta$ 6e über Exon1, Exon 2 und Exon 3, nested PCR-Methode mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Primern jeweils für den  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e- und eventuell  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3-Anteil; quantitative Auswertung als Quotient von  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e-Fluoreszenzanteil zum Gesamt-hCG-Anteil  $\beta$ 7,  $\beta$ 6- plus  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3-Anteil für die Bewertung des hochaufgebauten sekretorischen endometrialen Gewebes, Ergebnis 1 bei Normalgewebe und Ergebnis  $> 0$  bis 1 unterwertigem oder fehlenden sekretorisch transformierten Gewebes im Ausführungsbeispiel 1; oder aber die absolute quantitative Auswertung der exprimierten Kopienzahlen für die genspezifischen  $\beta$ hCG-Amplifikate  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e und Gesamt- $\beta$ hCG nach Real time-RT-PCR im Vergleich zu  $\beta$ hCG-sequenz-spezifischen Kalibratoren bei nicht-fluoreszenzmarkierten Primern und unter Verwendung von Standardmethoden für die Bewertung des normalen und neoplastischen Gewebes wie im Ausführungsbeispiel 2.

*Nutzung von Geräten und Material:* Gewebe in Flüssigstickstoff, Ultra Turrax-Gewebehomogenisation, Trizol-RNA-Extraktion, RT-PCR am Thermocycler, Fluoreszenzmessung des cDNA-Amplifikates am DNA Sequencer ABI 373A, Software Genescan 672 Fragment Analysis zur Auswertung, Flüssigstickstoff, Trizol, cDNA-Synthese-Kit, PCR-Amplifikationskit,  $\beta$ hCG-Primer für Gesamt- $\beta$ hCG-Amplifikation und nested PCR für  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e und  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 zum Teil fluoreszenzmarkiert.

30. *Beschreibung der Methode für Ausführungsbeispiel 1:* Extraktion der Gesamt-RNA: Das frische Gewebematerial wird sofort nach der Entnahme in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Gesamt-RNA wird mit der Methode nach Chomczynski und Sacchi (24) extrahiert, die gewonnene RNA spektrophotometrisch bei 260 nm / 280 nm quantifiziert, sofort weiterbearbeitet oder bei - 80° C gelagert.

*Reverse-Transkription:* 1 µg Gesamt-RNA wird in einem Reaktionsmix mit dem Totalvolumen von 5 µl nach der Standardmethode transkribiert: 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM jedes dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 5 200 ng Oligo dT-Primer pdT15, 12,5 U RNase Inhibitor, 2,5 U AMV-Revertase. Inkubation des Reaktionsgemisches für 10 min bei 25 °C (Hybridisierung des Primers), 30 min bei 42°C (Reversetranskription) und 5 min bei 95 °C (Denaturierung der Revertase und des RNase-Inhibitors) sowie Abkühlen auf 4 °C.

10 *PCR-Amplifikation der gesamten βhCG-Transkripte:* Zum cDNA-Produkt wird im selben Tube der PCR-Mix von 20 µl im Gesamtvolumen von 25 µl für die Amplifikation des Gesamt-βhCG-Transkriptes zugegeben: Endkonzentration von 10 mM Tris-HCl mit pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, je 5 pmol der beiden gewählten Primer und 2,5 U Taq-DNA-Polymerase. Die Amplifikationsbedingungen sind nach vorheriger 3 15 min-Inkubation bei 95 °C dann 30 sec 95 °C, 30 sec 60 °C, 60 sec 72 °C für 35 Zyklen mit abschließenden 7 min bei 72 °C und schnellem Abkühlen auf 4 °C.

*Nested PCR für βhCG β7, β6- und β5, β8, β3-Transkripte:* 2 µl des 1:10.000 verdünnten PCR-Produktes werden zu einem Gesamtvolumen von 20 µl in ein PCR- 20 Mix mit dem Endvolumen von 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 10 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 µM dNTP, 0,1pmol Primer 2, 0,1 pmol Primer 3, 0,1 pmol des Primers 4 und 2 U Taq DNA Polymerase (Stoffel-Fragment) zugefügt. Die Reaktion wird über 5 Zyklen am Thermocycler für je 30 sec bei 95 °C und 30 sec bei 65 °C durchgeführt. Die nested PCR Reaktion wird auch mit Taq DNA Polymerase unter Standardbedingungen 25 durchgeführt.

Das erhaltene Produkt enthält die zwei Amplifikationsprodukte für βhCG β7, β6, β6e und eventuell von hCG β5, β8, β3 mit je einem differenten Fluoreszenzmarker für Primer 4 und Primer 3, und beide Transkripte enthalten zusätzlich einen dritten gemeinsamen Fluoreszenzmarker des Primers 2.

30

Für die Analyse am DNA Sequenzer (Perkin-Elmer Modell 373A oder vergleichbare Modelle) werden 2,5 µl des Produktes mit 2 µl Loading buffer und 0,5 µl Genescan Size Marker und der Elpho bei 8 % Acrylamid, 6 M Harnstoff und TBE-Puffer für 1 Stunde unterzogen. Die Ergebnisse werden mit der GeneScan 672 Software (Perkin-Elmer)

analysiert unter Verwendung der ermittelten Fluoreszenzen für Gesamt- $\beta$ hCG-Transkripte und den  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e- sowie eventuell den  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3-Fragmenten.

Der Transkriptionsindex wird, wie bei Bellet et al. (17) beschrieben nach dieser Methode 5 errechnet.

### Ausführungsbeispiel 2

In diesem Ausführungsbeispiel wird zur Diagnostik der Rezeptivität der Uterusschleimhaut die absolute quantitative Auswertung der exprimierten Kopienzahlen 10 für die genspezifischen  $\beta$ hCG-Amplifikate  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e und eventuell  $\beta$ hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 nach Real time-RT-PCR im Vergleich zu  $\beta$ hCG-spezifischen Kalibratoren bei nicht-fluoreszenzmarkierten  $\beta$ hCG-Primern für die Bewertung des normalen hochaufgebauten oder unterwertigen oder fehlenden sekretorisch transformierten endometrialen Gewebes dargestellt.

15

Zur quantitativen Bestimmung der drei obengenannten  $\beta$ hCG-Expressionsanteile wird die Real time-PCR am Light Cycler (Roche) oder vergleichbaren Geräten anderer Firmen wie Applied Biosystems für die Amplifikation der Tumor-cDNA eingesetzt. Für die Synthese der RNA- Standards der drei  $\beta$ hCG-Expressionsanteile  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e sowie 20 eventuell  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 und das Gesamt- $\beta$ hCG werden die drei zugehörigen Kalibrationsfragmente unter Standard-PCR-Bedingungen aus endo-metrialer, plazentarer und Tumor-cDNA amplifiziert. Dafür werden wieder die drei genannten, jetzt unmarkierten  $\beta$ hCG Typ II ( $\beta$ 8,  $\beta$ 5,  $\beta$ 3) -,  $\beta$ hCG Typ I ( $\beta$ 7,  $\beta$ 6) - und Gesamt- $\beta$ hCG- 25 spezifischen forward- $\beta$ hCG-Primer (Primer 1, 3, 4 oder andere) mit dem gemeinsamen reverse- $\beta$ hCG-Primer (Primer 2 oder andere) benutzt. Die erhaltenen PCR-Produkte werden im Plasmid-Vector pGEM-T geklont. Unter Verwendung der T7- und Sp6- Promotoren der pGEM-T-Vectors dient das Plasmid als Template für die in vitro-Bildung von RNA entsprechend des Herstellerprotokolls. Die gebildeten Standard-RNA werden gereinigt und seine Konzentration vermessen.

30

Die Real time-PCR-Amplifikation am Light-Cycler (Roche) oder ABI-Systemen (Applied Biosystems) bestimmt die Anzahl der gebildeten Genkopien für die zwei genspezifischen  $\beta$ hCG-Expressionsgruppen Typ II ( $\beta$ 8,  $\beta$ 5,  $\beta$ 3) und Typ I ( $\beta$ 7,  $\beta$ 6) sowie Gesamt- $\beta$ hCG im endometrialen Gewebe und in den RNA-Standards und unter

Verwendung von den Primern 8, 9, 10 gegen 2 können auch die Einzelanteile von  $\beta$ 5,  $\beta$ 6 und  $\beta$ 7 erfaßt und absolut quantifiziert werden. Die PCR-Reaktion erfolgt im 20  $\mu$ l-Reaktionsvolumen in den Endkonzentrationen von 1 x PCR-Puffer von 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 200  $\mu$ M dNTPs, mit 0,5  $\mu$ M der jeweils spezifischen forward- und reverse-  
5  $\beta$ hCG-Primer, 4 bis 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 U Taq Polymerase, SYBR Green I mit 1:3000 der Stammlösung (Molecular Probes) und 1  $\mu$ l der Templates (Endometrium-cDNA gegen Standards bekannter Konzentration). Andere Methoden der Real time RT-PCR (TaqMan, FRET, Beacon) werden alternativ eingesetzt.

10 **Ausführungsbeispiel 3:**

Zur retrospektiven Diagnostik der Rezeptivität der Uterusschleimhaut für eine Embryoimplantation wird der Patientin Menstrualblut entnommen und die korpuskulären Zellanteile werden abzentrifugiert. Die Zellen werden bis zur Weiterverarbeitung sofort bei minus 80° C eingefroren und gelagert. Zur Analyse der mRNA-Expression des  
15 endometrialen  $\beta$ hCG wird wie in Ausführungsbeispiel 1 beschrieben verfahren.

Während für die prospektive Implantationsdiagnostik in der frühen bis mittleren Sekretionsphase des aktuellen Zyklus Gewebeproben des Endometriums, der Endocervix, Mundschleimhaut oder aus anderem ausgewählten Epithelium untersucht  
20 werden, um über die Qualität der sekretorischen Transformation und der zu erwartenden Rezeptivität des Endometriums (z. B. für die Entscheidung eines Embryotransfers oder Insemination im hormonell stimulierten Zyklus) zu entscheiden (zu befinden),

25 stellt die retrospektive Diagnostik der Rezeptivität der Uterusschleimhaut (z. B. Menstrualblut als nicht-invasive Methode) nach erfolgtem Embryotransfer oder nur nach stimuliertem oder unstimulierten Zyklus eine wichtige und einfache Methode dar, Aussagen über die sekretorische Transformation des Endometriums des vorangegangen Zyklus als Diagnostik und/oder ggf. Therapiekontrolle und Aussage für den Folgezyklus zu treffen. Evt. kann diese Methode die übliche (klinisch genutzte)  
30 invasive Methode der Strichabrasio in ihrer Aussage ergänzen oder ersetzen.

**Ausführungsbeispiel 4:**

Zur Tumordiagnostik werden der Patientin Zellen mit einem Minikatheter aus der Gebärmutterhöhle oder mit einem Wattebausch aus der Zervix oder mit einem Holzspatel

von der Mundschleimhaut entnommen. Die Zellen werden bis zur Weiterverarbeitung sofort bei minus 80° C eingefroren und gelagert. Zur Analyse wird aus den aufgenommenen Zellen eine Trizol-RNA-Extraktion durchgeführt, die cDNA des endometrialen  $\beta$ hCG im nachfolgenden RT-PCR-Prozeß spezifisch amplifiziert und quantitativ erfaßt.

5

Es kann davon ausgegangen werden, dass die Anwesenheit von hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8 und  $\beta$ 6e ein Indikator für eine Tumorerkrankung darstellt. Das Vorhandensein von hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 und  $\beta$ 3 zeigt das Gegenteil an: eine mögliche nicht-trophoblastäre Tumorerkrankung kann ausgeschlossen werden. Von besonderer Bedeutung ist der Fakt, dass mit der 10  $\beta$ hCG-Diagnostik aggressive Tumore erkannt werden kann, so dass die Diagnose auch einen Therapiehinweis gibt. Zu beachten ist, dass hCG  $\beta$ 6 und  $\beta$ 6e im wesentlichen durch hCG  $\beta$ 7 repräsentiert wird (siehe Ausführungsbeispiel 1). Die Untersuchungen werden vorteilhaft im Endometrium durchgeführt, um hier Karzinome zu erkennen. Gewebeproben können auch analog nach der Methode der fraktionierten Abrasio gewonnen werden.

Endometriales Gewebe oder Zellen dieser Herkunft (10 - 100 mg) werden sofort nach Entnahme in Flüssigstickstoff oder bei -80° C eingefroren. Für die Untersuchung der drei exprimierten Anteile hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 und  $\beta$ 6e sowie hCG  $\beta$ 8, 55,  $\beta$ 3 und Gesamt- $\beta$ hCG 20 wird die Total-RNA mit Trizol extrahiert und etwa 1  $\mu$ g der RNA für 60 min bei 42° C unter Standardbedingungen und Einsatz von Oligo-dT(15)-Primer reverse-transkribiert. *Nutzung von Methoden:* Gewebeentnahme zur Diagnostik, Lagerung in Flüssigstickstoff, RNA-Extraktion (23), RT-PCR mit fluoreszenzmarkiertem Primerpaar, Erfassung der Gesamt- $\beta$ hCG-Expression  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 und  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 und  $\beta$ 6e über Exon1, Exon 2 und 25 Exon 3, nested PCR-Methode mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Primern jeweils für den  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e und eventuell  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 Anteil; quantitative Auswertung als Quotient von  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e-Fluoreszenzanteil zum Gesamt-hCG-Anteil  $\beta$ 7,  $\beta$ 6- plus  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3-Anteil für die Bewertung des hochaufgebauten sekretorischen endometrialen Gewebes, Ergebnis 1 bei 30 Normalgewebe und Ergebnis > 0 bis 1 unterwertigem oder fehlenden sekretorisch transformierten Gewebes im Ausführungsbeispiel 4; oder aber die absolute quantitative Auswertung der exprimierten Kopienzahlen für die genspezifischen  $\beta$ hCG-Amplifikate  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e und Gesamt- $\beta$ hCG nach Real time-RT-PCR im Vergleich zu  $\beta$ hCG-sequenz-spezifischen Kalibratoren bei nicht-fluoreszenzmarkierten Primern und unter 35 Verwendung von Standardmethoden für die Bewertung des normalen und

dardmethoden für die Bewertung des normalen und neoplastischen Gewebes wie im Ausführungsbeispiel 5.

*Nutzung von Geräten und Material:* Gewebe in Flüssigstickstoff, Ultra Turrax-  
5 Gewebehomogenisation, Trizol-RNA-Extraktion, RT-PCR am Thermocycler, Fluores-  
zenzmessung des cDNA-Amplifikates am DNA Sequencer ABI 373A oder vergleichbare  
Modelle, Software Genescan 672 Fragment Analysis zur Auswertung, Flüssigstickstoff,  
Trizol, cDNA-Synthese-Kit, PCR-Amplifikationskit,  $\beta$ hCG-Primer für Gesamt- $\beta$ hCG-  
10 Amplifikation und nested RT-PCR für  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e und  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 zum Teil fluoreszenz-  
markiert.

*Beschreibung der Methode für Ausführungsbeispiel 4:* Extraktion der Gesamt-RNA: Das  
frische Gewebematerial wird sofort nach der Entnahme in Flüssigstickstoff eingefroren.  
Die Gesamt-RNA wird mit der Methode nach Chomczynski und Sacchi (24) extrahiert,  
15 die gewonnene RNA spektrophotometrisch bei 260 nm / 280 nm quantifiziert, sofort wei-  
terbearbeitet oder bei - 80 ° C gelagert.

*Reverse-Transkription:* 1  $\mu$ g Gesamt-RNA wird in einem Reaktionsmix mit dem Totalvo-  
lumen von 5  $\mu$ l nach der Standardmethode transkribiert: 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50  
20 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM jedes dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 200 ng Oligo dT-  
Primer pdT15, 12,5 U RNase Inhibitor, 2,5 U AMV-Revertase. Inkubation des Reakti-  
onsgemisches für 10 min bei 25 °C (Hybridisierung des Primers), 30 min bei 42 °C (Re-  
versetranskription) und 5 min bei 95 °C (Denaturierung der Revertase und des RNase-  
Inhibitors) sowie Abkühlen auf 4 °C.

25

*PCR-Amplifikation der gesamten  $\beta$ hCG-Transkripte:* Zum cDNA-Produkt wird im selben  
Tube der PCR-Mix von 20  $\mu$ l im Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l für die Amplifikation des Ge-  
samt- $\beta$ hCG-Transkriptes zugegeben: Endkonzentration von 10 mM Tris-HCl mit pH 8,3,  
50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTP, 5 pmol Primer 1, 5 pmol Primer 2 und 2,5 U  
30 Taq-DNA-Polymerase. Die Amplifikationsbedingungen sind nach vorheriger 3 min-  
Inkubation bei 95 °C dann 30 sec 95 °C, 30 sec 60 °C, 60 sec 72 °C für 35 Zyklen mit  
abschließenden 7 min bei 72 °C und schnellem Abkühlen auf 4 °C.

Nested PCR für  $\beta$ hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6- und  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3-Transkripte: 2  $\mu$ l des 1:10.000 verdünnten PCR-Produktes werden zu einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l in ein PCR-Mix mit dem Endvolumen von 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 10 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ M dNTP, 0,1 pmol Primer 2, 0,1 pmol Primer 3, 0,1 pmol des Primers 4 und 2 U Taq DNA Polymerase (Stoffel-Fragment) zugefügt. Die Reaktion wird über 5 Zyklen am Thermocycler für je 30 sec bei 95 °C und 30 sec bei 65 °C durchgeführt. Die nested PCR-Reaktion wird auch mit Taq DNA Polymerase unter Standardbedingungen durchgeführt.

Das erhaltene Produkt enthält die zwei Amplifikationsprodukte für  $\beta$ hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e und von hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 mit je einem differenten Fluoreszenzmarker für Primer 4 und Primer 3, und beide Transkripte enthalten zusätzlich einen dritten gemeinsamen Fluoreszenzmarker des Primers 2.

Für die Analyse am DNA Sequenzer (Perkin-Elmer Modell 373A oder vergleichbare Modelle) werden 2,5  $\mu$ l des Produktes mit 2  $\mu$ l Loading buffer und 0,5  $\mu$ l Genescan Size Marker und der Elpho bei 8 % Acrylamid, 6 M Harnstoff und TBE-Puffer für 1 Stunde unterzogen. Die Ergebnisse werden mit der GeneScan 672 Software (Perkin-Elmer) analysiert unter Verwendung der ermittelten Fluoreszenzen für Gesamt- $\beta$ hCG-Transkripte und den  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e- sowie eventuell den  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3-Fragmenten.

20

Der Transkriptionsindex wird, wie bei Bellet et al. (17) beschrieben nach dieser Methode errechnet.

### Ausführungsbeispiel 5

25 Tumorgewebe (50 - 200 mg) wird sofort nach Entnahme in Flüssigstickstoff eingefroren. Für die Untersuchung der drei exprimierten Anteile hCG  $\beta$ 8,  $\beta$ 5, 33 und hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 sowie Gesamt- $\beta$ hCG wird die Total-RNA mit Trizol extrahiert und etwa 1  $\mu$ g der RNA für 60 min bei 42° C unter Standardbedingungen und Einsatz von Oligo- dT(15) -Primer reverse-transkribiert.

30

Zur quantitativen Bestimmung der drei obengenannten  $\beta$ hCG-Expressionsanteile wird die Real time-PCR am Light Cycler (Roche) oder vergleichbaren Geräten anderer Firmen wie Applied Biosystems für die Amplifikation der Tumor-cDNA eingesetzt. Für die Synthese der RNA-Standards der drei  $\beta$ hCG-Expressionsanteile  $\beta$ 8,  $\beta$ 5,  $\beta$ 3 sowie  $\beta$ 7,

β6 und Gesamt-βhCG werden die drei zugehörigen Kalibrationsfragmente unter Standard-PCR-Bedingungen aus endometrialer, plazentarer und Tumor-cDNA amplifiziert. Dafür werden wieder die drei genannten, jetzt unmarkierten βhCG Typ II (β8, β5, β3) -, βhCG Typ I (β7, β6) - und Gesamt-βhCG-spezifischen forward-βhCG-Primer (Primer 1, 5 3 und 4 oder andere) mit dem gemeinsamen reverse-βhCG-Primer (Primer 2 oder andere) benutzt. Die erhaltenen PCR-Produkte werden im Plasmid-Vector pGEM-T geklont. Unter Verwendung der T7- und Sp6-Promotoren der pGEM-T-Vectors dient das Plasmid als Template für die in vitro-Bildung von RNA entsprechend des Herstellerprotokolls. Die gebildeten Standard-RNA werden gereinigt und seine Konzentration 10 messen.

Die Real time-PCR-Amplifikation am Light Cycler (Roche) oder ABI-Systemen (Applied Biosystems) bestimmt die Anzahl gebildeter Genkopien für die zwei genspezifischen βhCG-Expressionsgruppen Typ II (β8, β5, β3) und Typ I (β7, β6) sowie Gesamt-βhCG 15 im Tumorgewebe und in den RNA-Standards und unter Verwendung von den Primern 8, 9, 10 gegen 2 können auch die Einzelanteile von hCG β5, β6 und β7 erfaßt und absolutquantifiziert werden. Die PCR-Reaktion erfolgt im 20 µl-Reaktionsvolumen in den Endkonzentrationen von 1 x PCR-Puffer von 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 200 µM dNTPs, mit 0,5 µM der jeweils spezifischen forward- und reverse-βhCG-Primer, 4 bis 5 mM 20 MgCl<sub>2</sub>, 0,5 U Taq Polymerase, SYBR Green I mit 1:3000 der Stammlösung (Molecular Probes) und 1 µl der Templates (Tumor-cDNA oder Standards bekannter Konzentration). Andere Methoden der Real time RT-PCR (TaqMan, FRET, Beacon) werden ebenso eingesetzt.

25 Die Erfindung beansprucht auch die Real time-Messung als one tube-RT-PCR oder die Verwendung anderer Methoden zur quantitativen Erfassung der Expression spezifischer Genkopien neben SYBR Green I, wie zum Beispiel der Einsatz von genspezifischen Oligonukleotiden als Hybridisierungsproben mit unterschiedlichen Farbstoff- oder Fluoreszenzmarker-Anbindung (TaqMan, FRET, Beacon).

30

### Ausführungsbeispiel 6

Tumorgewebe wird zur Diagnostik entnommen und in Flüssig-Stickstoff gelagert. Nach einer RNA-Extraktion (23) folgt eine RT-PCR mit fluoreszenzmarkiertem Primerpaar entsprechend Ausführungsbeispiel 4. Die Gesamt-βhCG-Expression β5, β8, β3 und β7,

$\beta$ 6 über Exon1, Exon 2 und Exon 3 wird in einer nested PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern jeweils für den  $\beta$ 7,  $\beta$ 6- und  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3-Anteil erfasst und als Quotient von  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3-Anteil zu  $\beta$ 7,  $\beta$ 6- plus  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3-Anteil für die Bewertung des neoplastischen und tumorösen nicht-trophoblastären Gewebes wie folgt ausgewertet:

- 5 Ergebnis 0 bei Normalgewebe und Ergebnis > 0 bis 1 bei neoplastischem Gewebe – entsprechend Ausführungsbeispiel 4 Es erfolgt eine absolute quantitative Auswertung der exprimierten Kopienzahlen für die genspezifischen  $\beta$ hCG-Amplifikate  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 sowie  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 und Gesamt- $\beta$ hCG nach Real time-RT-PCR im Vergleich zu hCG-sequenzspezifischen Kalibratoren für die Bewertung des normalen und neoplastischen
- 10 Gewebes im Ausführungsbeispiel 5.

Nutzung von Geräten und Material: Gewebe in Flüssigstickstoff, Ultra Turrax-Gewebehomogenisation, Trizol-RNA-Extraktion, RT-PCR am Thermocycler, Fluoreszenzmessung des cDNA-Amplifikates am DNA Sequencer ABI 373A, Software Genescan 672 Fragment Analysis zur Auswertung, Flüssigstickstoff, Trizol, cDNA-Synthese-Kit, PCR-Amplifikationskit,  $\beta$ hCG-Primer für Gesamt- $\beta$ hCG-Amplifikation und nested PCR für  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 und  $\beta$ 7,  $\beta$ 6, zum Teil fluoreszenzmarkiert.

*Beschreibung der Methode für Ausführungsbeispiel 6:*

- 20 Extraktion der Gesamt-RNA: Das Gewebematerial wird sofort nach Entnahme in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Gesamt-RNA wird mit der Methode nach Chomczynski und Sacchi (24) extrahiert, die gewonnene RNA spektrophotometrisch bei 260 nm / 280 nm quantifiziert, sofort weiterbearbeitet oder bei - 80° C gelagert.
- 25 *Reverse-Transkription:* 1  $\mu$ g Gesamt-RNA wird in einem Reaktionsmix mit dem Gesamtvolumen von 5  $\mu$ l nach der Standardmethode transkribiert: 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM jedes dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 200 ng Oligo dT-Primer pdT15, 12,5 U RNase Inhibitor, 2,5 U AMV-Revertase (Roche). Inkubation des Reaktionsgemisches für 10 min bei 25 °C (Hybridisierung des Primers), 30 min bei 42 °C (Reversetranskription) und 5 min bei 95 °C (Denaturierung der Revertase und des RNase-Inhibitors) sowie Abkühlen auf 4 °C.

*PCR-Amplifikation der gesamten  $\beta$ hCG-Transkripte:* Zum cDNA-Produkt wird im selben Tube der PCR-Mix von 20  $\mu$ l im Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l für die Amplifikation des Gesamt- $\beta$ hCG-Transkriptes zugegeben: Endkonzentration von 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50

5 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, je 5 pmol der beiden gewählten Primer und 2,5 U Taq-DNA-Polymerase. Die Amplifikationsbedingungen sind nach vorheriger 3 min-Inkubation bei 95 °C dann 30 sec 95 °C, 30 sec 60 °C, 60 sec 72 °C für 35 Zyklen mit abschließenden 7 min bei 72 °C und schnellem Abkühlen auf 4 °C.

5

Nested PCR für  $\beta$ hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6- und  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3-Transkripte: 2 µl des 1:10.000 verdünnten PCR-Produktes werden zu einem Gesamtvolumen von 20 µl in ein PCR-Mix mit dem Endvolumen von 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 10 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 µM dNTP, 0,1 pmol Primer 2, 0,1 pmol Primer 3, 0,1 pmol des Primers 4 und 2 U Taq DNA

10 Polymerase (Stoffel-Fragment) zugefügt. Die Reaktion wird über 5 Zyklen am Thermocycler für je 30 sec bei 95 °C und 30 sec bei 65 °C durchgeführt. Die nested PCR Reaktion wird auch mit Taq DNA Polymerase unter Standardbedingungen durchgeführt.

15 Das erhaltene Produkt enthält die zwei Amplifikationsprodukte für  $\beta$ hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 und  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 mit je einem differenten Fluoreszenzmarker für Primer 3 und Primer 4, und beide Transkripte enthalten zusätzlich einen dritten gemeinsamen Fluoreszenzmarker des Primers 2.

20 Für die Analyse am DNA Sequenzer (Perkin-Elmer-Modell 373A oder vergleichbare Modelle) werden 2,5 µl des Produktes mit 2 µl Loading buffer und 0,5 µl Genescan Size Marker und der Elpho bei 8 % Acrylamid, 6 M Harnstoff und TBE-Puffer für 1 Stunde unterzogen. Die Ergebnisse werden mit der GeneScan 672 Software (Perkin-Elmer) analysiert unter Verwendung der ermittelten Fluoreszenzen für Gesamt- $\beta$ hCG-  
25 Transkripte und den  $\beta$ 7,  $\beta$ 6- sowie  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3-Fragmenten.

Der Transkriptionsindex wird, wie bei Bellet et al. (17) beschrieben, nach dieser Methode als Quotient von  $\beta$ hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 zur Summe von  $\beta$ hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 und  $\beta$ 5, 8,  $\beta$ 3 errechnet.

30 Die vorgestellte Erfindung bringt eine Reihe wesentlicher Vorteile mit sich. Die erhaltenen Ergebnisse gewinnen an Zuverlässigkeit, weil es mehrere Ansatzpunkte für den Indikator gibt. Im Unterschied zu der bekannten technischen Lösung, die ausschließlich auf die Punktmutation 117 in Exon 3 abstellt, bezieht unsere Lösung Exon 2 und ein Promotorgen ein. Unser Verfahren ermöglicht eine Unterscheidung in bösartige und in

gutartige Tumore mit den gewünschten Folgen für einen Therapieansatz. Das basiert auf der Erkenntnis, dass der Grad der Bösartigkeit eines nicht-trophoblastären Tumors durch die Anwesenheit von hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 indiziert wird. Dessen Konzentration wird im Ausführungsbeispiel 4 als Fluoreszenzwert gemessen und zu hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 in Beziehung gesetzt, indem der Quotient von hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 zur Summe von hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 plus hCG  $\beta$ 6,  $\beta$ 7 gebildet wird.

5 Im Ausführungsbeispiel 5 wird die Anwesenheit von hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3 durch Real time-RT-PCR durch die Kopienzahl seiner Genexpression im Vergleich zur sequenzspezifischen  $\beta$ hCG-Standardreihe wie auch von hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6 absolut quantifiziert.

10

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise mit einem Testkit durchgeführt, der die folgenden Bestandteile enthält:

Reaktionslösungen	Ingredienzien
1. Primer 1	nicht-markierter Primer 1
2. Primer 2	fluoreszenzmarkierter Primer 2
3. Primer 3	fluoreszenzmarkierter Primer 3
4. Primer 4	fluoreszenzmarkierter Primer 4
5. RT-Reaktionsmix	RT-Reaktionspuffer mit dNTPs, Oligo-pdT15, RNase-Inhibitor für cDNA-Bildung
6. Reverse Transkriptase	Stammlösung für RT
7. PCR-Reaktionsmix	PCR-Reaktionspuffer
8. PCR-Polymerase	Taq-DNA-Polymerase
9. nested PCR-Reaktionsmix	nested PCR-Reaktionspuffer

15 Der mRNA-Quantifizierungskit für  $\beta$ hCG gene  $\beta$ 5,  $\beta$ 7 gestattet die hochempfindliche und spezifische Bestimmung der Genexpression von  $\beta$ hCG im normalen und Tumorgewebe für die Diagnostik und Therapiekontrolle.

20 Die mit den Methoden der Real-time-RT-PCR amplifizierten spezifischen  $\beta$ hCG  $\beta$ 5- und  $\beta$ hCG  $\beta$ 7-Kopien können über einen breiten Meßbereich mit je einem Satz bereitstehender Kalibrationsstandards von  $\beta$ hCG  $\beta$ 5- und  $\beta$ hCG  $\beta$ 7-mRNA erfaßt werden.

**Abkürzungsverzeichnis**

cDNA	komplementäre DNA
CTP	C-terminales Peptid
5 ELISA	Enzyme linked immmonsorbent assay
ET	Embryotransfer
hCG	humane Choriongonadotropin
α-hCG	alpha Untereinheit des hCG
β-hCG	beta Untereinheit des hCG
10 thCG	trophoblastär exprimierte Form des hCG
HRP	Horse radish peroxidase – Meerrettichperoxidase
βLH	β Luteinisierendes Hormon
PBS	Phosphat buffer saline (Natriumphosphatpuffer)
pdT15	Primer poly-deoxyThymidin aus 15 Monomeren aufgebaut 15
15 Mab	monoklonaler Antikörper
MEIA	Mikropartikel Enzymimmunoassay
M	mol/Liter
mRNA	Messenger-RNA
PCR	Polymerasekettenreaktion
20 RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR

**Zitierte Nicht-Patentliteratur:**

( 1) J.C.Pierce, T.F.Parsons, *Annu.Rev.Biochem.*, **50** (1981) 465-495

5 ( 2) P.A.Rothman et al. *Mol.Reprod.Dev.*, **33** (1992) 1-6

( 3) S.Dirnhofer et al. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, **81** (1996) 4212-4217

10 ( 4) Z.M.Lei et al. , *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, **77** (1993) 863-972

( 5) T.Yokotani et al. *Int.J.Cancer*, **71** (1997) 539-544

( 6) P.Berger et al. *FEBS Lett.*, **343** (1994) 229-233

15 ( 7) I.Marcilliac et al., *Cancer Res.*, **52** (1992) 3901-3907

( 8) H.Alfthan, et al., *Clin.Chem.*, **38** (1992) 1981-1987

20 ( 9) V.Lazar et al., *Cancer Res.*, **55** (1995) 3735-3738

(10) P.N.Span et al., *J.Endocrinol.*, **172** (2002) 489-495

(11) M.Lundin, et al., *Int.J.Cancer*, **95** (2001) 18-22

25 (12) K.Hotakainen et al., *Brit.J.Cancer*, **86** (2001) 185-189

(13) D.S.Hoon, et al., *Int.J.Cancer*, **69** (1996) 369-374

(17) D.Bellet, et al., *Cancer Res.*, **57** (1997) 516-523

30 (18) P.K.Hotakainen et al., *Mol.Cell.Endocrinol.*, **162** (2000) 79-85

(19) A.K.Miller-Lindholm, et al., **138** (1997) 5459-5465

35 (20) S.Madersbacher, et al., *Cancer Res.*, **54** (1994) 5096-5100

(21) R.Oyasu, et al., *Arch.Pathol.Lab.Med.*, **119** (1994) 715-717

## Patentansprüche:

1. Verfahren zur Bestimmung von definierten Zuständen oder Veränderungen in der Uterusschleimhaut oder im Epithel anderer Organe, bei dem RNA aus einer Blut- und/oder Gewebeprobe isoliert wird und in dieser Probe eine quantitative Messung der Expression oder Überexpression der mRNA von  $\beta$ 7-hCG und/oder  $\beta$ 6-hCG und/oder  $\beta$ 6e-hCG erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** zusätzlich eine quantitative Messung der Gesamt- $\beta$ hCG-mRNA-Expression oder der mRNA-Expression von  $\beta$ 5-hCG und/oder  $\beta$ 8-hCG und/oder  $\beta$ 3-hCG erfolgt und mit der mRNA-Expression von  $\beta$ 7-hCG- und/oder  $\beta$ 6-hCG und/oder  $\beta$ 6e-hCG in Relation gesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** die quantitative Messung der mRNA-Expression mittels quantitativer RT-PCR oder Real-time-RT-PCR erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** basierend auf der durch die Reverse Transkriptase (RT) erhaltenen cDNA in einem ersten PCR-Schritt mit mindestens einem ersten Primerpaar Gesamt- $\beta$ hCG-cDNA amplifiziert wird, wobei das erste Primerpaar sowohl mit cDNA von  $\beta$ 5-hCG,  $\beta$ 8-hCG,  $\beta$ 3-hCG, als auch  $\beta$ 7-hCG und  $\beta$ 6-hCG und  $\beta$ 6e-hCG hybridisiert, und in einem anschließenden zweiten PCR-Schritt mit mindestens einem dritten Primer die cDNA von  $\beta$ 7-hCG- und/oder  $\beta$ 6-hCG und/oder  $\beta$ 6e-hCG spezifisch amplifiziert wird, wobei der dritte Primer mit cDNA von  $\beta$ 7-hCG und  $\beta$ 6-hCG und  $\beta$ 6e-hCG spezifisch hybridisiert, jedoch nicht mit cDNA von  $\beta$ 5-hCG,  $\beta$ 8-hCG und  $\beta$ 3-hCG.

Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** in dem zweiten PCR-Schritt zusätzlich mit mindestens einem vierten Primer die cDNA von  $\beta$ 5-hCG und/oder  $\beta$ 8-hCG und/oder  $\beta$ 3-hCG spezifisch amplifiziert wird, wobei der vierte Primer mit cDNA von  $\beta$ 5-hCG,  $\beta$ 8-hCG und  $\beta$ 3-hCG spezifisch hybridisiert, jedoch nicht mit cDNA von  $\beta$ 7-hCG und  $\beta$ 6-hCG und  $\beta$ 6e-hCG.

- 5 5. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** als erstes Primerpaar Oligonukleotide aus der Gruppe von Sequenzen gemäß SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 11 und SEQ ID NO 14 im ersten PCR-Schritt und als dritter Primer ein Oligonukleotid aus der Gruppe von Sequenzen gemäß SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 13 und SEQ ID NO 16 im zweiten PCR-Schritt eingesetzt werden.
- 10 15 6. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** als vierter Primer ein Oligonukleotid aus der Gruppe von Sequenzen gemäß SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 12 und SEQ ID NO 15 im zweiten PCR-Schritt eingesetzt wird.
- 20 25 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** mindestens ein Primer fluoreszenzmarkiert ist.
8. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** ein Primer des ersten Primerpaars, der dritte Primer und gegebenenfalls der vierte Primer mit Fluoreszenzmarkern die sich in Ihren Adsorptions- und/oder Emmissionspektren zueinander unterscheiden, versehen sind.
- 30 9. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur prospektiven oder retrospektiven Diagnostik einer endometrialen Rezeptivität für eine Embryoimplantation.
10. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass einer Patientin Peripherblut oder Gewebe von Endometrium oder Zervix entnommen wird und die Analyse der mRNA-Expression in dieser Blut- oder

Gewebeprobe erfolgt und aus der Höhe der ermittelten mRNA-Expression von  $\beta$ 7-hCG und/oder  $\beta$ 6-hCG und/oder  $\beta$ 6e-hCG Rückschlüsse auf die Aufnahmefähigkeit der Gebärmutter für einen Embryo im aktuellen Zyklus getroffen werden.

5

11. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Analyse der mRNA-Expression in einer Probe von Menstrualblut einer Patientin erfolgt und aus der Höhe der ermittelten mRNA-Expression von  $\beta$ 7-hCG und/oder  $\beta$ 6-hCG und/oder  $\beta$ 6e-hCG im abgelaufenen Zyklus Prognosen auf die potentielle Aufnahmefähigkeit der Gebärmutter für einen Embryo im Folgezyklus erstellt werden.

10

12. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Tumordiagnose.

15

13. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass zum Nachweis von Uteruskarzinomen einer Patientin Gewebe von Endometrium oder Zervix entnommen wird und die Analyse der mRNA-Expression in dieser Gewebeprobe erfolgt.

20

14. Verwendung nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Werte der mRNA-Expression in Tumorgewebe mit den Werten der mRNA-Expression in gesundem Gewebe verglichen werden.

25

15. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Wert der Promoter-Expression von  $\beta$ 5-hCG und/oder  $\beta$ 8-hCG und/oder  $\beta$ 3-hCG ermittelt wird und vorzugsweise durch die mRNA-Expression von Gesamt- $\beta$ hCG geteilt wird und aus der Höhe des so erhaltenen Quotienten Rückschlüsse auf den Grad der Bösartigkeit des Tumors getroffen werden.

30

16. Primersequenz gemäß SEQ ID NO 3 oder SEQ ID NO 4 oder einer der SEQ ID NO 8 bis SEQ ID NO 16.

17. Diagnostischer Kit zur Bestimmung von definierten Zuständen bzw. Veränderungen im Uterus durch quantitative RT-PCR enthaltend jeweils eine Menge

- a.) Oligo-dT,
- 5 b.) des Enzyms Reverse Transkriptase,
- c.) von mindestens zwei Primern, die mit cDNA von  $\beta$ 7-hCG- und/oder  $\beta$ 6-hCG und/oder  $\beta$ 6e-hCG hybridisieren, wobei mindestens einer der beiden Primer nicht mit  $\beta$ 5-hCG und/oder  $\beta$ 8-hCG und/oder  $\beta$ 3-hCG hybridisiert,
- 10 d.) einer über 80°C beständigen DNA-Polymerase,
- e.) Reaktionspuffer.

18. Diagnostischer Kit nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet, dass** er ein erstes Primerpaar enthält, das sowohl mit cDNA von  $\beta$ 5-hCG,  $\beta$ 8-hCG,  $\beta$ 3-hCG, als auch  $\beta$ 7-hCG und  $\beta$ 6-hCG und  $\beta$ 6e-hCG hybridisieren, und einen dritten Primer der spezifisch mit cDNA von  $\beta$ 7-hCG und  $\beta$ 6-hCG und  $\beta$ 6e-hCG hybridisiert, jedoch nicht mit cDNA von  $\beta$ 5-hCG,  $\beta$ 8-hCG und  $\beta$ 3-hCG.

20 19. Diagnostischer Kit nach Anspruch 18 oder 19, **dadurch gekennzeichnet, dass** er einen vierten Primer enthält, der mit cDNA von  $\beta$ 5-hCG,  $\beta$ 8-hCG und  $\beta$ 3-hCG spezifisch hybridisiert, jedoch nicht mit cDNA von  $\beta$ 7-hCG und  $\beta$ 6-hCG und  $\beta$ 6e-hCG.

25 20. Diagnostischer Kit nach Anspruch 19, **dadurch gekennzeichnet, dass** er jeweils eine Menge eines Primerpaars ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzen gemäß SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 11 und SEQ ID NO 14 eines dritten Primers ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzen gemäß SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 13 und 30 SEQ ID NO 16 enthält.

21. Diagnostischer Kit nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet, dass er eine Menge eines vierten Primers ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzen gemäß SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 12 und SEQ ID NO 15 enthält.**

5

22. Diagnostischer Kit nach einem der Ansprüche 18 bis 22, **dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Primer fluoreszenzmarkiert ist.**

10

23. Diagnostischer Kit nach Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet, dass ein Primer des ersten Primerpaars, der dritte Primer und gegebenenfalls der vierte Primer mit Fluoreszenzmarkern die sich in Ihren Adsorptions- und/oder Emmissionspektren zueinander unterscheiden, versehen sind.**

15

24. Diagnostischer Kit nach einem der Ansprüche 18 bis 24, **dadurch gekennzeichnet, dass er eine definierte Menge mRNA oder cDNA von  $\beta$ 5-hCG und/oder  $\beta$ 7-hCG als Standard enthält.**

20

25. Verwendung des diagnostischen Kits nach einem der Ansprüche 18 bis 25 zur prospektiven oder retrospektiven Diagnostik einer endometrialen Rezeptivität für eine Embryoimplantation.

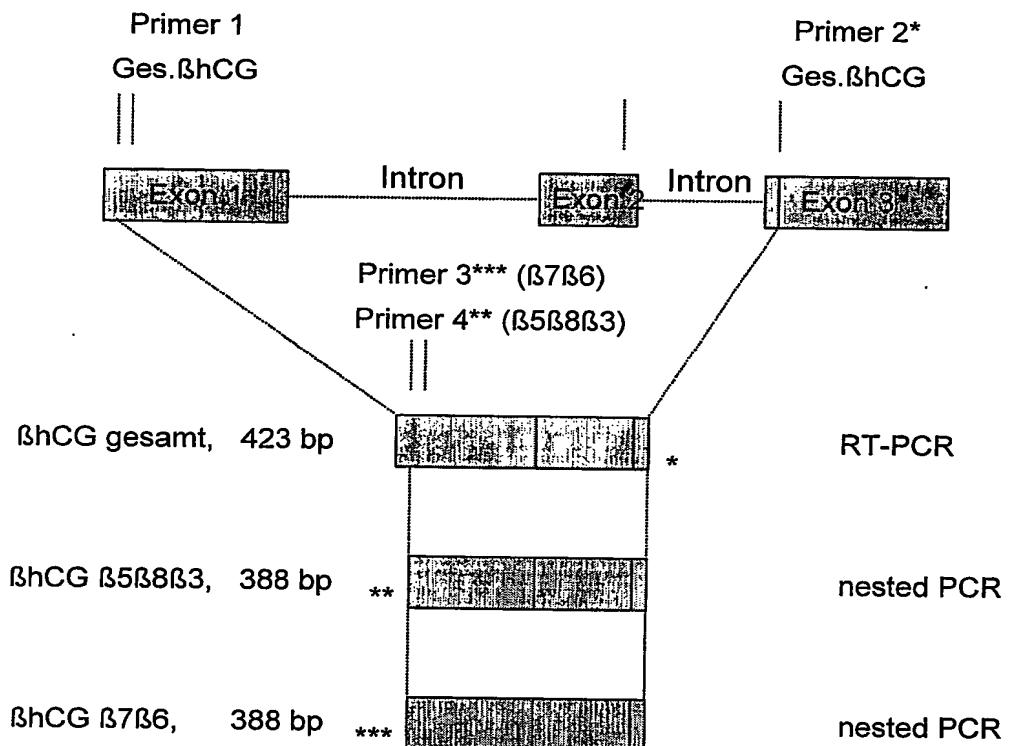
26. Verwendung des diagnostischen Kits nach einem der Ansprüche 18 bis 26 zur Tumordiagnose.

25 27. Variante  $\beta$ 6e des  $\beta$ 6- oder  $\beta$ 7-Gens mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No 7 und/oder codierend für ein Protein mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID 17 oder SEQ ID No 18.

30 28. Verwendung einer Gensequenz gemäß Anspruch 28 und/oder SEQ ID No 5 und/oder SEQ ID No 6 als Marker zur prospektiven oder retrospektiven Diagnostik einer endometrialen Rezeptivität für eine Embryoimplantation.

29. Verwendung einer Gensequenz gemäß Anspruch 26 und/oder SEQ ID No 5 und/oder SEQ ID No 6 als Marker zur Tumordiagnostik.

30. Verwendung der Gensequenzen SEQ ID No 1 bis ID No 16 mit oder ohne Fluoreszenzmarker-Konjugation für die quantitative Messung der Genexpression von  $\beta$ 5-hCG und/oder  $\beta$ 8-hCG und/oder  $\beta$ 3-hCG und/oder  $\beta$ 7-hCG und/oder  $\beta$ 6-hCG und/oder  $\beta$ 6e-hCG $\beta$  mit den Methoden der Real time-RT-PCR zur prospektiven oder retrospektiven Diagnostik einer endometrialen Rezeptivität für eine Embryoimplantation und Tumordiagnostik.



Fluoreszenzmarker: \* NED, \*\* HEX, \*\*\*6-FAM

**Fig. 1**

\*

CG5	.....	ctaaaTCCAGCA	CTTTGCTCGGGTCACGGCCTCCTCGGCT	Primer15/16	
CG6		cttcagTCCAGCA	CTTTCTCGGGTCACGGCCTCCTCGGTT		-330
CG7		cttgagTCCAGCA	CTTTTCTCGGGTCACGGCCTCCTCGGTT		
Endo				Primer14	CC1CGTT
CG5	CCCAGGACCCACCATAGGCAGAGGCAGGC	CTTCCTACACCCCTACTCCCTGTGCCTCCAG			-270
CG6	CCCAAGACCCACCATAGGCAGAGGCAGGC	CTTCCTACACCCCTACTCTGTGCCTCCAG			
CG7	CCCAAGACCCACCATAGGCAGAGGCAGGC	CTTCCTACACCCCTACTCTGTGCCTCCAG			
Endo	CCCAAGACCCACCATAGGCAGAGGCAGGC	CTTCCTACACCCCTACTCTGTGCCTCCAG			
CG5	GCTCGACTAGTCCCTAGCACTCGACGACTG	AGTCTCTGAGGTCACTTCACCGTGGTCTCC	Primer 1		-210
CG6	CCTCGACTAGTCCCTAACACTCGACGACTG	AGTCTCAGAGGTCACTTCACCGTGGTCTCC			
CG7	CCTCGACTAGTCCCTAGCACTCGACGACTG	AGTCTCAGAGGTCACTTCACCGTGGTCTCC			
Endo	CCTCGACTAGTCCCTAGCACTCGACGACTG	AGTCTCAGAGGTCACTTCACCGTGGTCTCC			
CG5	GCCTCACCCCTGGCGCTGGACCAGTGAGAG	GAGAGGGCTGGGGCGCTCCGCTGAGCCACT	Primer3/4		-150
CG6	GCCTCATCCTGGCGTAGACCACTGAGGG	GAGAGGACTGGGGTGCTCCGCTGAGCCACT			
CG7	GCCTCATCCTGGCGTAGACCACTGAGGG	GAGAGGACTGGGGTGCTCCGCTGAGCCACT			
Endo	GCCTCATCCTGGCGTAGACCACTGAGGG	GAGAGGACTGGGGTGCTCCGCTGAGCCACT			
CG5	CCTGCCCCCCCTGGCTTGTCTACCTCTT	GCCCCCGAAGGGTTAGTGTGAGCTCACC			-90
CG6	CCTGTGCCCTCCCTGGCTTGTCTACCTCTC	GCCCCCGAAGGGTTAGTGTGAGCTCACT			
CG7	CCTGTGCCCTCCCTGGCTTGTCTACCTCTC	GCCCCCGAAGGGTTAGTGTCCAGCTCACT			
Endo	CCTGTGCCCTCCCTGGCTTGTCTACCTCTC	GCCCCCGAAGGGTTAGTGTCCAGCTCACT			
CG5	CCAG-CATCCTACAACTCCTGGTGGCCTT	GCGCCCCCACACCCCGAGGTATAAAGCC			-30
CG6	CCAG-CATCCTACAACTCCTGGTGGCCTT	GCGCCCCCACACCCCGAGGTATAAAGCC			
CG7	CCAG-CATCCTACAACTCCTGGTGGCCTT	GACGCCCCCACACCCCGAGGTATAAAGCC			
Endo	CCAG-CATCCTACAACTCCTGGTGGCCTT	GCGCCCCCACACCCCGAGGTATAAAGCC			
	-1	+1**			
CG5	AGGTACACGAGGCAGGGGACGCACCAAGG	ATGGAGATGTTCCAGGGCTGCTGCTTTG			+30
CG6	AGGTACACGAGGCAGGGGACGCACCAAGG	.....			
CG7	AGGTACACGAGGCAGGGGACGCACCAAGG	.....			
Endo	AGGTACACGAGGCAGGGGACGCACCAAGG	ATGGAGATGTTCCAGGGCTGCTGCTTTG			
	Primer 8/9/10				
CG5	CTGCTGCTGAGCATGGCGGGACATGGGCA	TCCAAGGGAGCCGCTTCGGCCACGGTGCCGC			+90
CG6	.....	A.....CCA.....			
CG7	.....	G.....ATG.....			
Endo	CTGCTGCTGAGCATGGCGGGACATGGGCA	TCCAAGGGAGATGCTTCGGCCACGGTGCCGC			
	20	30			
CG5	CCCATCAATGCCACCCCTGGCTGTGGAGAAG	GAGGGCTGCCCGTGTGCATCACCGTCAAC			+150
CG6	.....	.....			
CG7	.....	.....			
Endo	CCCATCAATGCCACCCCTGGCTGTGGAGAAG	GAGGGCTGCCCGTGTGCATCACCGTCAAC			
	40 ***	50			
CG5	ACCACCATCTGTGCCGGACTGCCCCACC	ATGACCCCGCGTGTGCAGGGGGTCTGCCG			+210
CG6	.....	.....			
CG7	.....	.....			
Endo	ACCACCATCTGTGCCGGACTGCCCCACC	ATGACCCCGCGTGTGCAGGGGGTCTGCCG			
	60	70			
CG5	GCCCTGCCCTCAGGTGGTGTGCAACTACCGC	GATGTGCGCTTCGAGTCCATCCGGCTCCCT			+270
CG6	.....	.....			
CG7	.....	.....			
Endo	GCCCTGCCCTCAGGTGGTGTGCAACTACCGC	GATGTGCGCTTCGAGTCCATCCGGCTCCCT			
	80	90			
CG5	GGCTGCCCGCGCGCGTGAACCCCGTGGTC	TCCTACGCCGTGGCTCTCAGCTGTCAATGT			+330
CG6	.....	.....			
CG7	.....	.....			
Endo	GGCTGCCCGCGCGCGTGAACCCCGTGGTC	TCCTACGCCGTGGCTCTCAGCTGTCAATGT			
	100	110			
CG6	.....	.....			
CG7	.....	.....			
Endo	GCACTCTGCCGCCGACCACTGACTGC	GGGGCTCCCAAGGACCACCCCTGACCTGT			
	Primer12/13	117	120	130	
CG5	GATGACCCCCCGCTTCCAGGACTCCTCTTC	TCAAAGGCCCCCTCCCCCCCAGCCTTCCAAGT			+450
CG6	.....	GCC.....			
CG7	.....	C.....			
Endo	GATGACCCCCCGCTTCCAGGCTCTTCC	TCAAAGGCCCCCTCCCCCCCAGCCTTCCAAGT			
	Primer11	140	145		
CG5	CCATCCCGACTCCGGGCCCTCGGACACC	CCGATCCTCCCACAAAtaaa.....			+510
CG6	.....	.....			
CG7	.....	.....			
Endo	CCATCCCGACTCCGGGCCCTCGGACACC	CCGATCCTCCCACAA			

## Sequenzprotokoll - Sequence Listing

<110> Universität Leipzig  
<120> Verfahren und Mittel zur Bestimmung von bestimmten Zuständen bzw.  
Veränderungen im Uterusepithel und in Epithelien anderer Organe  
<130> 401P04PCT  
<150> DE10260556.4  
<151> 2002-12-21  
<150> DE10325637.7  
<151> 2003-06-06  
<150> DE10325636.9  
<151> 2003-06-06

<160> 18

<210> 1  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial  
<220>  
<223> Primer 1 ( $\beta$ hCG gesamt)  
<301> Lindholm-Miller A.K. Labenz C.J., Ramey J., Bedows E., Ruddon R.W.  
<302> Human Chorionic Gonadotropin- $\beta$ -Gene Expression in First Trimester  
Placenta  
<303> Endocrinology  
<304> 138  
<305> 12  
<306> 5459-5465  
<307> 1997

<400>  
tcacttcacc gtgggtctccg

20

<210> 2  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial  
<220>  
<223> Primer 2 ( $\beta$ hCG gesamt)  
<301> Lindholm-Miller A.K. Labenz C.J., Ramey J., Bedows E., Ruddon R.W.  
<302> Human Chorionic Gonadotropin- $\beta$ -Gene Expression in First Trimester  
Placenta  
<303> Endocrinology  
<304> 138  
<305> 12  
<306> 5459-5465  
<307> 1997

<400> 2  
tgcagcacgc gggtcatgg

20

<210> 3  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> artificial  
<220>  
<223> Primer 3 ( $\beta$ hCG B7, B6, B6e)

<400> 3  
cactgagggg agaggactgg ggt

23

<210> 4  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> artificial  
<220>  
<223> Primer 4 ( $\beta$ hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3)

<400> 4  
cagttagagg agagggctgg ggc

23

<210> 5  
<211> 861  
<212> DNA  
<213> human  
<220>  
<223>  $\beta$ hCG  $\beta$ 7 cDNA-Sequenz

<400>5  
agcactttcc tcgggtcacg gcctcctcct ggttcccaag accccaccat aggcagaggg 60  
aggccttcct acaccctact ctctgtgcct ccagcctcga cttagtcccta gcactcgacg 120  
actgagtcctc agaggtcact tcaccgtggt ctccgcctca tccttggcgc tagaccactg 180  
aggggagagg actgggggtgc tccgctgagc cactcctgtg cctccctggc cttgtctact 240  
tctcgccccc cgaagggtta gtgtccagct cactccagca tcctacaacc tcctggtgc 300  
cttgacgccc ccacaaaacc gagggtataaa gccaggtaca ccaggcaggg gacgcaccaa 360  
ggatggagat gttccagggg ctgctgtgt tgctgctgct gacatggc gggacatggg 420  
catccaagga gatgttcgg ccacgggtgcc gccccatcaa tgccaccctg gctgtggaga 480  
aggagggctg ccccggtgtgc atcaccgtca acaccacca ctgtgcccgc tactgcccc 540  
ccatgacccg cgtgtgtcag ggggtctgc cggccctgccc tcaggtggtg tgcaactacc 600  
gcgatgtgcg ctgcgtgtcc atccggctcc ctgctgccc ggcggcgtg aaccccggtgg 660  
tctcctacgc cgtggctctc agctgtcaat gtgcactctg ccgcggcagc accactgact 720  
gcgggggtcc caaggaccac cccttgaccc gtgatgaccc ccgcgttccag gcctcctctt 780  
cctcaaaggc ccctcccccc agccttccaa gtccatcccg actcccgggg ccctcgacca 840  
ccccgatcct cccacaataa a 861

<210> 6  
<211> 861  
<212> DNA  
<213> human  
<220>  
<223>  $\beta$ hCG  $\beta$ 6 cDNA-Sequenz

<400>6  
agcactttcc tcgggtcacg gcctcctcct ggttcccaag accccaccat aggcagaggg 60  
aggccttcct acaccctact ctctgtgcct ccagcctcga cttagtcccta acactcgacg 120  
actgagtcctc agaggtcact tcaccgtggt ctccgcctca tccttggcgc tagaccactg 180  
aggggagagg actgggggtgc tccgctgagc cactcctgtg cctccctggc cttgtctact 240  
tctcgccccc cgaagggtta gtgtcgagct cactccagca tcctacaacc tcctggtgc 300  
cttgccgccc ccacaaaacc gagggtatgaa gccaggtaca ccaggcaggg gacgcaccaa 360  
ggatggagat gttccagggg ctgctgtgt tgctgctgct gacatggc gggacatggg 420  
catccaagga gccacttcgg ccacgggtgcc gccccatcaa tgccaccctg gctgtggaga 480  
aggagggctg ccccggtgtgc atcaccgtca acaccacca ctgtgcccgc tactgcccc 540  
ccatgacccg cgtgtgtcag ggggtctgc cggccctgccc tcaggtggtg tgcaactacc 600  
gcgatgtgcg ctgcgtgtcc atccggctcc ctgctgccc ggcggcgtg aaccccggtgg 660  
tctcctacgc cgtggctctc agctgtcaat gtgcactctg ccgcggcagc accactgact 720  
gcgggggtcc caaggaccac cccttgaccc gtgatgaccc ccgcgttccag gcctcctctt 780  
cctcaaaggc ccctcccccc agccttccaa gtccatcccg actcccgggg ccctcgacca 840  
ccccgatcct cccacaataa a 861

<210> 7  
 <211> 861  
 <212> DNA  
 <213> human  
 <220>  
 <223>  $\beta$ hCG  $\beta$ 6e cDNA-Sequenz

<400>7  
 agcacttttc tcgggtcacg gcctcctcct ggttcccaag accccaccat aggcagaggg 60  
 aggccttcct acaccctact ctctgtgcct ccagectcga ctatgcctca rcaactcgacg 120  
 actgagtctc agaggtaact tcaccgtggc ctcgcctca tccttgggyc tagaccactg 180  
 aggggagagg actgggggtgc tccgctgagc cactctgtg cctccctggc ttgtctact 240  
 ttcgcggccc cgaagggtta gtgtcsagct cactccagca tcctacaacc tcctgggtggc 300  
 cttgmcgccc ccacaamccc gaggtatrraa gccaggtaca ccaggcaggg gacgcaccaa 360  
 ggatggagat gttccagggg ctgctgctgt tgctgctgct gagcatggc gggacatggg 420  
 catccargga gmyrcttcgg ccacgggtgcc gccccatcaa tgccaccctg gctgtggaga 480  
 aggagggctg ccccggtgtgc atcaccgtca acaccatctg cttgtccggc tactgcccc 540  
 ccatgaccgg cgtgctgcag ggggtccctgc cggccctgca tcaggtggtg tgcaactacc 600  
 gcgatgtgcg cttcgagtc atccggctcc ctggctgccc gcgccggcgtg aaccccggtgg 660  
 totcctacgc cgtggctctc agctgtcaat gtgcactctg ccggccgcagc accactgact 720  
 gcggggggtcc caaggaccac cccttgaccc gtgatgaccc cggcttccag gcctcctt 780  
 cctcaaaggc ccctcccccc agccttccaa gtccatcccg actccccgggg ccctcggaca 840  
 ccccgatcct cccacaataa a 861

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Primer 8 ( $\beta$ hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3)

<400> 8  
 catgggcattt caaggagccg 20

<210> 9  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Primer 9 ( $\beta$ hCG  $\beta$ 6)  
 <400> 9

catgggcattt caaggagccg 20

<210> 10  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Primer 10 ( $\beta$ hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6e)  
 <400> 10

catgggcattt cagggagatg 20

<210> 11  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Primer 11 (Gesamt-  $\beta$ hCG)

<400> 11  
 tcgggggtgtc cgagggc 17

<210> 12  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial  
<220>  
<223> Primer 12 ( $\beta$ hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3)

<400> 12  
gatgacccccc gcttccagga

20

<210> 13  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial  
<220>  
<223> Primer 13 ( $\beta$ hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6)

<400> 13  
gatgacccccc cgttccaggc

20

<210> 14  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> artificial  
<220>  
<223> Primer 14 (Gesamt- $\beta$ hCG)

<400> 14  
tcgggtcacg gcctcct

17

<210> 15  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> artificial  
<220>  
<223> Primer 15 ( $\beta$ hCG  $\beta$ 5,  $\beta$ 8,  $\beta$ 3)

<400> 15  
acggcctcct cctggctccc ag

22

<210> 16  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> artificial  
<220>  
<223> Primer 16 ( $\beta$ hCG  $\beta$ 7,  $\beta$ 6,  $\beta$ 6e)

<400> 16  
acggcctcct cctggttccc aa

22

<210> 17  
<211>..165  
<212> PRT  
<213> human  
<220>  
<223>  $\beta$ hCG  $\beta$ 6eI (with Lys in Pos 2)

<400> 17  
Met Glu Met Phe Gln Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Met Gly  
-20 -15 -10 . -5

Gly Thr Trp Ala Ser Lys Glu Met Leu Arg Pro Arg Cys Arg Pro Ile  
.. 1 5 10

Asn Ala Thr Leu Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr  
15 .. 20 25

Val Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Met Arg Val  
30 .. 35 40

Gly Val Leu Gln Leu Pro Ala Leu Pro Gln Val Val Cys Asn Tyr Arg  
45 .. 50 55 60

Asp Val Arg Phe Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val  
65 70 75

Asn Pro Val Val Ser Tyr Ala Val Ala Leu Ser Cys Gln Cys Ala Leu  
80 85 90

Cys Arg Arg Ser Thr Thr Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu  
95 100 105

Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro  
110 115 120

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr  
125 130 135 140

Pro Ile Leu Pro Gln  
145

<210> 18  
<211>..165  
<212> PRT  
<213> human  
<220>  
<223>  $\beta$ hCG  $\beta$ 6eII (with Arg in Pos 2)

<400> 18  
Met Glu Met Phe Gln Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Met Gly  
-20 -15 -10 . -5

Gly Thr Trp Ala Ser Arg Glu Met Leu Arg Pro Arg Cys Arg Pro Ile  
.. 1 5 10

Asn Ala Thr Leu Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr  
15 .. 20 25

Val Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Met Arg Val  
30 .. 35 40

Gly Val Leu Gln Leu Pro Ala Leu Pro Gln Val Val Cys Asn Tyr Arg  
45 .. 50 55 60

Asp Val Arg Phe Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val  
65 70 75

Asn Pro Val Val Ser Tyr Ala Val Ala Leu Ser Cys Gln Cys Ala Leu  
80 85 90

Cys Arg Arg Ser Thr Thr Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu  
95 100 105

Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro  
110 115 120

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr  
125 130 135 140

Pro Ile Leu Pro Gln  
145

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**